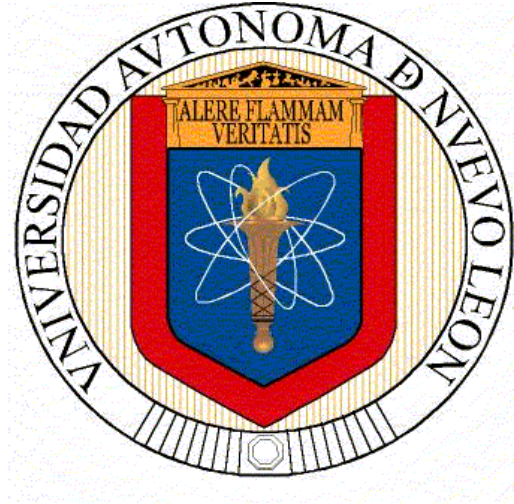


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



“Desarrollo de un Implante de CMM Modificadas  
Genéticamente para Reemplazo de Cartílago”

Por:

M. en C. Idalia Garza Veloz

Como requisito parcial para obtener el grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS con Orientación en Biología  
Molecular e Ingeniería Genética

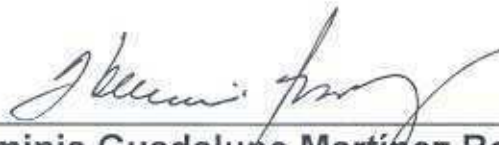
Junio, 2012

# **Desarrollo de un implante de CMM modificadas genéticamente para reemplazo de cartilago**

Aprobación de Tesis:



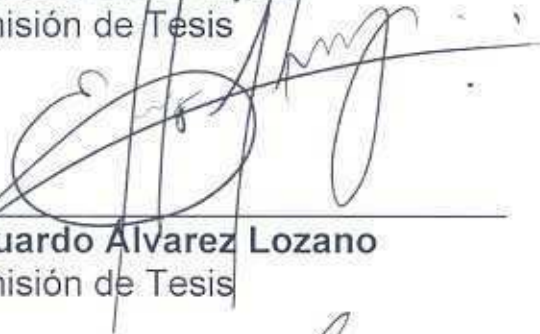
**Dr. C. Augusto Rojas Martínez**  
Director de Tesis



**Dr. C. Herminia Guadalupe Martínez Rodríguez**  
Co-director de Tesis



**Dr. C. Rocío Ortiz López**  
Comisión de Tesis



**Dr. med. Eduardo Álvarez Lozano**  
Comisión de Tesis



**Dr. C. Salvador Said Fernández**  
Comisión de Tesis



**Dr. med. Gerardo Enrique Muñoz Maldonado**  
Subdirector de estudios de posgrado

Este trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Terapia Génica del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Este trabajo fue apoyado por CONACYT, con número de registro: SSA/IMSS/ISSSTE-CONACYT-112606-2009, realizado bajo la supervisión del Dr. Augusto Rojas Martínez como director, la Dra. Herminia Guadalupe Martínez Rodríguez como co-director y los doctores Rocío Ortiz López, Eduardo Álvarez Lozano y Salvador Said Fernández como comisión.

**“En teoría, no existe diferencia entre teoría y práctica; en la práctica sí la hay”.**

Jan L.A. van de Snepscheut.

## AGRADECIMIENTOS

A **Dios** por amarme, permitirme vivir y darme la provisión suficiente para cumplir mis sueños en la vida.

A mi **Familia** (Papá, Mamá, Chely y Pedro) por apoyarme, estar conmigo, ser mi soporte en todo momento y permitirme realizar todas mis metas y proyectos.

A mi Asesor **Dr. Augusto Rojas Martínez**, se que muchas veces lo desespere, pero muchas gracias por tenerme paciencia, por dirigirme, enseñarme, darme la confianza y apoyarme en la realización de esta tesis y del posgrado.

A **Margarita de la Luz Martínez Fierro** por ser mi mentor, tener el tiempo y paciencia para enseñarme y apoyarme en todo, gracias por la espera.

A mis amigos y compañeros **Yolanda Ortiz, Maribel Luna, Mariana Elizondo, Diana Pérez, Michelle Zamudio, Carlos Cancela, Iram, Arturo Quintanilla, y a todos los de TG: Adelina Hernández, Marcela, Gissela Borrego, Sergio Cardenas, Iván Marino, Dante....** Por estar ahí y traer diversión y alegría a mi vida.

A todo el **personal y maestros** del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina, UANL. Por hacerme la vida más fácil, y compartirme sus experiencias y enseñanzas.

A las instituciones que apoyaron el proyecto y por ende a la realización de esta tesis, **CONACyT SSA/IMSS/ISSSTE-CONACYT-112606-2009.**

A la **Universidad Autónoma de Nuevo León**, siempre llevare conmigo el mejor de los regalos “la educación” y a donde quiera que yo vaya siempre seré orgullosamente UANL.

**MIL GRACIAS!!!**

# ÍNDICE

CONTENIDO	Página
LISTA DE TABLAS	
LISTA DE FIGURAS	
ABREVIATURAS	
RESUMEN	
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Desarrollo embriológico del sistema esquelético osteoarticular	1
1.2 Histogenia del cartílago	2
1.3 Cartílago articular o hialino	2
1.3.1. Los condrocitos	3
1.3.2. La matriz extracelular	5
1.3.2.1. El fluido tisular	5
1.3.2.2. La red estructural de macromoléculas	5
1.3.2.2.1. Los colágenos	6
1.3.2.2.2. Los proteoglicanos	6
1.3.2.2.3. Las proteínas no colágenas y las glicoproteínas	8
1.4. Regiones del cartílago articular	8
1.4.1. Las zonas del cartílago articular	8
1.4.1.1. La zona superficial	9
1.4.1.2. La zona transicional	10
1.4.1.3. La zona media (radial o profunda)	10
1.4.1.4. La zona de cartílago calcificado	11
1.4.2. Las regiones de la matriz extracelular	11
1.4.2.1. La región pericelular	11
1.4.2.2. La región territorial	11
1.4.2.3. La región intraterritorial	12
1.5. Interacciones entre los condrocitos y la matriz	12
1.6. Obstáculos en la reparación fisiológica del cartílago articular	13
1.6.1. Factores vinculados a la anatomía del cartílago articular	13
1.6.2. Factores inherentes a los condrocitos	14
1.6.3. Factores relacionados con la matriz extracelular	14
1.6.4. Respuesta del cartílago articular a las lesiones mecánicas	14
1.7. Historia natural de las lesiones del cartílago articular	15
1.8. Diagnóstico de las lesiones condrales	16
1.9. Clasificaciones de las lesiones del cartílago articular	17
1.10. Prevalencia e incidencia de las lesiones condrales	18
1.11. Tratamiento de las lesiones condrales	19
1.11.1. Técnicas quirúrgicas para la reparación del cartílago articular	19
1.11.1.1. Técnicas paliativas	20
1.11.1.1.1. Lavado articular	20
1.11.1.1.2. Estímulo osteocondral	21
1.11.1.1.2.1. Perforaciones del hueso subcondral (Pridie)	21
1.11.1.1.2.2. Artroplastia de abrasión	22
1.11.1.1.2.3. Microfracturas	22

1.11.1.2. Técnicas de reparación y/o de regeneración cartilaginosa	23
1.11.1.2.1. Aloinjertos osteocondrales	23
1.11.1.2.2. Autoinjertos osteocondrales	24
1.11.1.2.3. Injertos de periostio	25
1.11.1.2.4. Injertos de pericondrio	26
1.11.1.2.5. Cultivo de condrocitos	27
1.11.1.2.6. Matrices para la reparación del cartílago	29
1.11.1.2.7. Terapia génica, células madre	31
2. JUSTIFICACIÓN	34
3. OBJETIVOS	34
3.1. Objetivo general	34
3.2. Objetivos específicos	34
4. ESTRATEGIA GENERAL	35
5. MATERIAL Y MÉTODOS	36
5.1. Preparación de vectores adenovirales recombinantes	36
5.2. Aislamiento, cultivo y caracterización de CMMs	36
5.3. Ensayo de viabilidad celular	37
5.4. Transducción adenoviral de las CMMs en monocapa	37
5.5. Ensayo de qRT-PCR	38
5.6. Análisis bioquímico	39
5.7. Análisis histológico e inmunohistoquímico	39
5.8. Análisis de western blot y densitometría	40
5.9. Cultivo de CMMs en soporte de alginato	40
5.10. Análisis estadístico	41
6. RESULTADOS	43
6.1. Aislamiento, cultivo y expansión de las CMMs	43
6.2. Caracterización fenotípica de CMMs	44
6.3. Construcción de los vectores adenovirales	46
6.3.1. Caracterización de los vectores recombinantes pAdEasy-(IGF-1, TGF- $\beta$ 1, FGF-2 y SOX9)	48
6.3.2. Cuantificación de vectores adenovirales	52
6.4. Viabilidad celular y eficiencia de transducción de las CMMs con vectores adenovirales	52
6.5. Diferenciación condrogénica de CMMs después de la entrega adenoviral de IGF-1, TGF- $\beta$ 1, FGF-2 y SOX9 solos o en combinación	54
6.6. Expresión génica de los marcadores condrogénicos a través del tiempo	57
6.7. Ensayos bioquímicos para la determinación del contenido de DNA, GAGs y Colágeno	62
6.8. Implante de CMMs transducidas con IGF-1/FGF-2 en soporte de alginato	63
7. DISCUSIÓN	66
8. CONCLUSIONES	71

9. PERSPECTIVAS	71
10. REFERENCIAS	72



## LISTA DE TABLAS:

<b>Tabla 1</b>	Descripción de los primers utilizados en el estudio
<b>Tabla 2</b>	Caracterización fenotípica de CMMs mediante inmunofenotipo y RT-PCR
<b>Tabla 3</b>	Descripción de los primers utilizados en la construcción de los vectores adenovirales
<b>Tabla 4</b>	Cuantificación de los vectores adenovirales obtenidos

## LISTA DE FIGURAS:

- Fig. 1** Corte histológico de CA o hialino
- Fig. 2** Fotografías de condrocitos con microscopio electrónico de transmisión, a partir de CA de cóndilo femoral medial de conejo esqueléticamente maduro
- Fig. 3** Esquema de la estructura de un proteoglicano
- Fig. 4** Estructura del CA de cóndilo femoral medial de conejo New Zealand de ocho meses de edad
- Fig. 5** Reparación fisiológica del CA
- Fig. 6** Lesiones del CA
- Fig. 7** Artroplastia de abrasión
- Fig. 8** Técnica de microfractura mediante artroscopía
- Fig. 9** Fases del autoinjerto osteocondral mediante mosaicoplastia
- Fig. 10** Técnica quirúrgica del injerto de periostio
- Fig. 11** Esquema para el procedimiento de transplante de condrocitos autólogos
- Fig. 12** Técnica de la segunda generación de ACI
- Fig. 13** ACI de tercera generación
- Fig. 14** Aislamiento de CMMs de *Ovis aries*
- Fig. 15** Cultivo de CMMs
- Fig. 16** Inmunofenotipo por citometría de flujo
- Fig. 17** RT-PCR
- Fig. 18** qRT-PCR
- Fig. 18** Gel de agarosa 2% con productos de PCR para los factores IGF-1, TGF- $\beta$ 1, FGF-2 y SOX9
- Fig. 19** Diseño *in silico* de los vectores pAdEasy-Gen obtenidos
- Fig. 20** Caracterización de los vectores recombinantes pAdEasy-Gen obtenidos mediante enzimas de restricción BamH I y Pme I

- Fig. 21** Geles de agarosa 0.8% con los productos de amplificación gen específico por PCR para los vectores recombinantes
- Fig. 22** Cultivos de células Hek-293 transfectadas con los vectores recombinantes seleccionados.
- Fig. 23** Productos de amplificación gen específico por PCR de los adenovirus recombinantes producidos
- Fig. 24** Secuenciación de los adenovirus recombinantes producidos
- Fig. 25** Cuantificación de los vectores adenovirales mediante el método de TCID<sub>50</sub>
- Fig. 26** Ensayos de viabilidad celular (día 20)
- Fig. 27** Viabilidad de las CMMs con transducción adenoviral simple y combinada
- Fig. 28** Condrogénesis de CMMs por transferencia génica mediada por adenovirus
- Fig. 29** Cartílago hialino de traquea humana
- Fig. 30** Western blot y análisis densitométrico
- Fig. 31** Tamaño y forma de los agregados y análisis bioquímico
- Fig. 32** Implante de CMMs modificadas genéticamente en soporte de alginato
- Fig. 33** Ensayo inmunohistoquímico realizado a implantes de CMMs modificadas genéticamente en soporte de alginato

## ABREVIATURAS

ACI	Implante de condrocitos autólogos
AGC	Agrecano
ALO	Aloinjerto osteocondral
BGC	Biglicano
BMPs	Proteínas morfogénicas de hueso
CA	Cartílago articular
CM	Matriz de cartílago
CMMs	Células madre mesenquimales
COL I	Colágeno tipo I
COL II	Colágeno tipo II
COL X	Colágeno tipo X
DMB	1,9-dimetilmetileno azul
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
EGF	Factor de crecimiento epidermal
FC	Fibrocartílago
FGF	Factor de crecimiento a fibroblastos
GAG	Glicosaminoglicanos
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato deshidrogenasa
GFP	Proteína verde fluorescente
ICRS	International Cartilage Research Society
IGF-1	Factor de crecimiento similar a insulina-1
IT	Ingeniería de tejidos
LA	Lavado articular
MACI	Matrix-induced autologous chondrocyte implantation
MEC	Matriz extracelular
MO	Médula ósea
MOI	Multiplicidad de infección
OA	Osteoartritis
OHP	Hidroxiprolina
PBS	Phosphate buffered saline
PGA	Ácido poliglicólico
PGC	Proteoglicano
PLA	Ácido poliláctico
qRT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RF	Radiofrecuencia
RMN	Resonancia magnética nuclear
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa reversa
SBF	Suero bovino fetal
SOX9	Sex determining region Y-box 9
TA	Tejido adiposo
TCID <sub>50</sub>	Tissue culture infectious dose 50
TG	Transferencia génica
	TGF- $\beta$ Factor de crecimiento transformante beta

# RESUMEN

**M. en C. Idalia Garza Veloz**

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina

Fecha de graduación: Junio, 2012

Área de estudio: Terapia Génica

Candidato para el grado de Doctor en Ciencias con Especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética.

Número de páginas: 80

**Título del estudio: DESARROLLO DE UN IMPLANTE DE CMM MODIFICADAS GENÉTICAMENTE PARA REEMPLAZO DE CARTÍLAGO.**

**INTRODUCCIÓN.** Debido a la escasa capacidad de regeneración del cartílago articular, numerosos estudios han explorado nuevas terapias basadas en células para el tratamiento de lesiones condrales. Tras la estimulación con factores de crecimiento, las células madre mesenquimales (CMMs) derivadas de tejido adiposo tienen la capacidad de diferenciarse en tejidos conectivos tales como cartílago, hueso, etc. A pesar de que las CMMs son potencialmente útiles como fuente de células alternas a los condrocitos, se requieren mejores métodos para estimular efectivamente su proliferación y diferenciación a condrocitos. En este estudio, se evaluó la condrogénesis *in vitro* de las CMMs derivadas de tejido adiposo, después de modificarlas genéticamente con vectores adenovirales que codifican para factores de crecimiento condrogénicos.

**MÉTODOS.** Se construyeron vectores adenovirales que portan el cDNA codificante para TGF- $\beta$ 1, IGF-1, FGF-2 y SOX9 de *Homo sapiens*. Se aislaron CMMs de tejido adiposo proveniente de un *Ovis aries* joven. Cultivos confluentes de CMMs en monocapa se infectaron con 100 MOIs de cada adenovirus recombinante individual (Ad.IGF-1, Ad.TGF- $\beta$ 1, Ad.FGF-2 y Ad.SOX9), o en combinación (Ad.IGF-1/Ad.TGF- $\beta$ 1, Ad.IGF-1/Ad.FGF2, Ad.IGF-1/Ad.TGF- $\beta$ 1/Ad.SOX9 y Ad.IGF-1/Ad.FGF2/Ad.SOX9) y se cultivaron durante 3, 7, 14, 21 y 28 días. Se extrajo el RNA total y se retrotranscribió a cDNA. Se utilizó qRT-PCR para evaluar la expresión de los genes específicos de cartílago en cada tiempo. La evaluación de los proteoglicanos y el colágeno de la matriz se realizaron mediante las tinciones de azul de toluidina, safranina-O y fast green.

**RESULTADOS.** Los niveles de expresión de los factores de crecimiento con los que fueron modificadas genéticamente las CMMs fueron altos en el día 3 y disminuyeron posteriormente. Se encontró que la co-expresión de IGF-1 y FGF-2 incrementó los niveles de expresión de agregano, proteoglicano, biglicano, proteína de cartílago de la matriz, colágeno II y X, e indujo la condrogénesis de las CMMs mejor que cualquiera de los demás transgenes individuales o combinados, como se evidencia por una mayor tinción de proteoglicanos y colágeno tipo II y X.

**CONCLUSIONES.** Nuestros hallazgos indican que la condrogénesis inducida de CMMs transducidas con la combinación de genes IGF-1 y FGF-2, mediante vectores adenovirales, permite la creación de un implante de cartílago potencialmente útil para estudios en modelos animales y futuros ensayos clínicos.

Apoyo financiero **CONACYT: SSA/IMSS/ISSSTE-CONACYT-112606-2009**

---

**Dr. Augusto Rojas Martínez**  
DIRECTOR DE TESIS

# **Desarrollo de un implante de CMM modificadas genéticamente para reemplazo de cartílago**

## **1. Introducción**

Las enfermedades musculoesqueléticas, como la osteoartritis (OA), las lesiones traumáticas de las articulaciones y la artrosis degenerativa, afectan al 15% de la población mexicana, reduciendo severamente la calidad de vida de los pacientes y costando un exceso de 5 millones por año [1, 2]. En 2007 se estimó que el costo anual en el tratamiento de la OA y reparación del cartílago fue de \$28.6 billones de dólares solamente en USA [3]. Con el creciente envejecimiento de la población, se prevé que el número de personas afectadas y la consiguiente carga para los sistemas sanitarios aumentarán drásticamente en los próximos años [4, 5]. Las opciones de tratamiento disponibles actualmente incluyen el uso de injertos de tejido y prótesis articulares, sin embargo estos métodos están limitados por la escasa disponibilidad de tejido de un donante adecuado y el riesgo de infección y fracaso asociado al reemplazo articular total [6]. Estas limitaciones son la fuerza impulsora detrás de muchas investigaciones sobre métodos basados en células para el tratamiento efectivo del cartílago dañado o lesionado [7]. La ingeniería de tejidos (IT) ha sido definida como "un campo interdisciplinario que aplica los principios de la ingeniería y las ciencias de la vida hacia el desarrollo de sustitutos biológicos que restauren, mantengan o mejoren la función del tejido" [8]. Las estrategias de la IT generalmente implican las siguientes etapas: (1) identificación y aislamiento de una fuente adecuada de células, (2) fabricación de un dispositivo para transportar o encapsular las células, (3) siembra uniforme de células en la superficie o en el interior del dispositivo y su cultivo adecuado, e (4) implantación in vivo del implante construido [9]. A la fecha los estudios de IT en cartílago, han abordado la utilización de diferentes tipos de células, soportes o andamios y sistemas de cultivo.

En esta sección se describe al cartílago, su composición, estructura y función; el cartílago dañado y su reparación; y a la IT como un método potencial para la reparación de los defectos del cartílago.

### **1.1. Desarrollo embriológico del sistema esquelético osteoarticular**

El sistema esquelético se desarrolla a partir de la capa germinativa mesodérmica que aparece en el fondo del surco de la línea primitiva durante la tercera semana de desarrollo embrionario. El mesodermo se sitúa entre el ectodermo y endodermo y comienza a diferenciarse en una porción

dorsomedial (mesodermo paraxial) que se divide a cada lado del tubo neural en una serie de bloques o segmentos de células epitelioides llamados somitas, una porción intermedia (mesodermo intermedio) que originará el aparato urogenital y una porción lateral (lámina lateral) que dará lugar a la cavidad torácica.

Poco después de su formación, cada somita se diferencia en una porción ventromedial o esclerotomo, y en una parte dorsolateral o dermatomiotomo. A partir de la zona lateral del dermatomiotomo se origina un tejido conjuntivo, situado debajo de la piel, que dará lugar a la dermis. De su porción dorsal se formarán la mayor parte de los músculos.

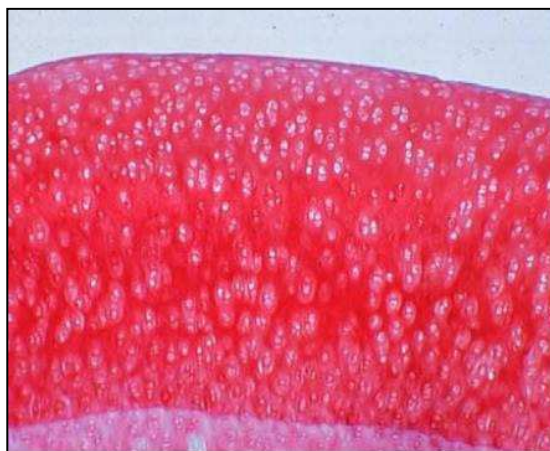
Al finalizar la cuarta semana, las células del esclerotomo se tornan polimorfas y constituyen un tejido laxo denominado mesénquima o tejido conectivo embrionario cuya característica principal es que migran y se diferencian, pudiendo transformarse en cualquiera de las células formadoras de hueso, fibroblastos, condroblastos u osteoblastos, que se distribuirán para dar lugar a las distintas estructuras esqueléticas [10].

#### **1.4. Histogenia del cartílago**

El cartílago se desarrolla a partir del mesénquima y aparece por primera vez en el embrión a lo largo de la quinta semana. En las áreas en las que se ha de formar cartílago, el mesénquima se condensa y da lugar a centros de condricificación. Las células mesenquimatosas proliferan y se redondean. Las células formadoras de cartílago o condroblastos secretan fibrillas de colágeno y la sustancia fundamental de la matriz. Después se depositan fibras de colágeno o elásticas en la sustancia intercelular o matriz. Se pueden distinguir tres tipos de cartílago en función del tipo de matriz formada: cartílago elástico, articular o hialino y fibrocartílago [11].

#### **1.5. Cartílago articular o hialino**

El cartílago articular (CA) (también llamado cartílago hialino), es un tejido elástico avascular, aneural y alinfático, que recubre la superficie articular de los huesos de las articulaciones diartroidales y que tiene como función soportar las cargas, proporcionar una excelente fricción, lubricación y las características de desgaste requeridas para el continuo movimiento de deslizamiento. También funciona absorbiendo el choque mecánico y distribuyendo la fuerza aplicada sobre las estructuras óseas de soporte. En condiciones fisiológicas, el CA (Fig. 1) puede llevar a cabo sus funciones biomecánicas esenciales durante cinco o seis décadas experimentando poco deterioro.



**Figura 1.** Corte histológico de CA o hialino

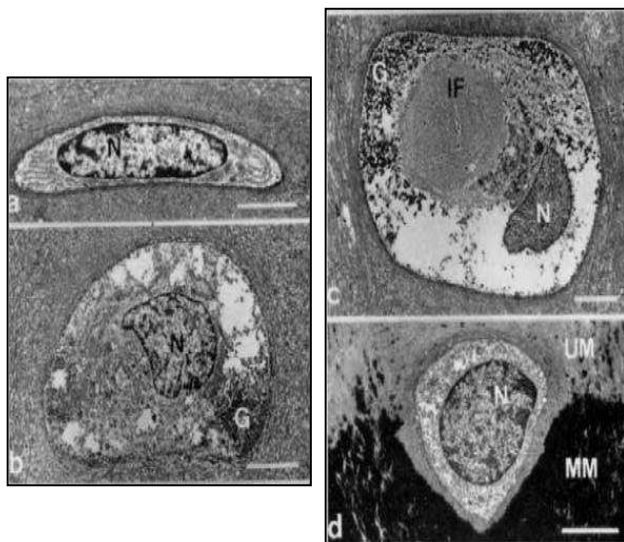
Al igual que otros tejidos conectivos del organismo, incluyendo tendones, ligamentos y meniscos, el CA está constituido por una matriz rica en agua, una estructura de fibras macromoleculares y por un número relativamente pequeño de células que reciben el nombre de condrocitos [12].

### **1.3.1. Los condrocitos**

Los condrocitos (Fig. 2) son células altamente especializadas que producen y mantienen la matriz extracelular (MEC) del cartílago. Ocupan menos del 10 % del volumen tisular total, con variaciones de unas articulaciones a otras. Los condrocitos de las distintas capas del CA difieren en forma, tamaño y probablemente en actividad metabólica. Todos ellos poseen la ultraestructura necesaria para la síntesis de los componentes de la MEC. Además, estas células cuentan con filamentos intracitoplasmáticos, lípidos, glucógenos y cilios de la célula a la matriz, que se cree que tienen un rol de detección de cambios en la mecánica del entorno [13].

Los condrocitos no mantienen contacto entre si y están rodeados por tres capas concéntricas de MEC distinguibles en su composición. Estas capas, desde la célula a la periferia, se denominan: región pericelular, región territorial y región interterritorial (Fig. 2). Cuando se mide la actividad metabólica del condrocito como célula individual se observa que ésta es muy elevada, pero al medir la actividad metabólica del CA como tejido nos encontramos que es escasa debido a la poca densidad celular [14].





**Figura 2.** Fotografías de condrocitos con microscopio electrónico de transmisión, a partir de CA de cóndilo femoral medial de un conejo esqueléticamente maduro. (a) zona superficial, (b) zona intermedia, (c) zona radial, (d) zona de cartílago calcificado, N= núcleo, G= glucógeno, IF= Filamentos intermedios, UM= Matriz no mineralizada. MM= Matriz mineralizada. La barra representa 3  $\mu$ m [14].

Por todas estas características parece que, en primera instancia, los condrocitos juegan un papel secundario en el funcionamiento del CA maduro, pues las propiedades mecánicas del tejido dependen básicamente de su MEC. Sin embargo, una matriz formada artificialmente combinando únicamente las proporciones adecuadas de agua y de macromoléculas, no es suficiente para obtener los mismos resultados que el tejido natural. El mantenimiento de esas propiedades mecánicas requiere de un recambio de macromoléculas de la matriz, consistente en la reposición continua de los elementos que hayan sido degradados. Probablemente requieran además, de alteraciones en la red macromolecular en respuesta al uso de la articulación, por lo que se cree que son los condrocitos los que responden sintetizando tipos apropiados de macromoléculas en cantidades justas.

En el cartílago maduro los condrocitos se nutren de moléculas que deben vencer una doble barrera de difusión para alcanzar a la célula. La primera barrera es el tejido y el líquido sinovial y la segunda es la matriz del cartílago. Esta última no solo es restrictiva con respecto al tamaño de los materiales, también lo es a la carga eléctrica de los nutrientes y a su configuración molecular. Las características de estas barreras dejan a los condrocitos en una baja concentración relativa de oxígeno por lo que cuentan principalmente con un metabolismo anaeróbico.

La actividad y función de los condrocitos durante el crecimiento esquelético cambian en función de las fases del crecimiento. En las primeras etapas del desarrollo, el cartílago tiene una alta densidad de condrocitos que proliferan rápidamente y que producen tejido nuevo para expandir y remodelar la superficie articular, por lo que es en este momento cuando alcanzan su máxima actividad metabólica. En los mamíferos en crecimiento, los condrocitos producen MEC fundamentalmente en

dos zonas: la zona periférica, que aumenta y expande la superficie articular y la zona central que sirve como centro de osificación endocondral de la epífisis.

Cuando se alcanza la madurez esquelética, las tasas de actividad metabólica, síntesis de matriz y de división celular, disminuyen notoriamente. Al completar el crecimiento, probablemente la mayoría de los condrocitos no volverán a dividirse, pero continuarán sintetizando colágeno, PGC y proteínas no colágenas.

La permanencia de esta capacidad de síntesis sugiere que el CA requiere de una renovación continua de la red de macromoléculas de la matriz, regulada por las mismas células, pero influenciadas por otros factores tales como la frecuencia e intensidad de las cargas articulares.

A medida que envejece el individuo, la capacidad de las células de sintetizar algunos tipos de PGC y de responder al estímulo externo, incluyendo factores de crecimiento, disminuyen. Estos cambios relacionados con la edad, pueden limitar la habilidad de las células en mantener el tejido y por lo tanto contribuir al desarrollo de la degeneración del CA [4].

### **1.3.2. La matriz extracelular**

La MEC del CA tiene fundamentalmente dos componentes: el fluido tisular y la red de macromoléculas. La asociación de ambas le confieren al tejido forma y propiedades mecánicas de rigidez y resistencia.

#### **1.3.2.1. El fluido tisular**

El fluido tisular del cartílago está constituido por agua, gases, pequeñas proteínas, metabolitos y una alta concentración de cationes para equilibrar la carga negativa de los PGC. El agua puede constituir hasta un 80 % del peso húmedo del CA. Su volumen y concentración está determinada por la interacción con las macromoléculas de la matriz (fundamentalmente con los PGC) y es un factor importante en determinar las propiedades mecánicas del tejido.

#### **1.3.2.2. La red estructural de macromoléculas**

Las macromoléculas estructurales del cartílago son fundamentalmente los colágenos, los PGC y algunas proteínas no colágenas (se incluyen en este grupo a las glucoproteínas) [14]. Estas tres clases de macromoléculas se diferencian en su concentración en el tejido y en su contribución a las propiedades tisulares. Los colágenos constituyen cerca del 60 % del peso seco del cartílago; los PGC de un 25 % a 35 % y las proteínas no colágenas y glucoproteínas de un 15 % a 20 %. Los colágenos están distribuidos relativamente de modo uniforme en la profundidad del cartílago, a

excepción de la zona superficial rica en colágeno. La red de colágeno fibrilar da al cartílago forma y fuerza tensil [14]. Los PGC y las proteínas no colágenas se unen a la red de colágeno para interactuar mecánicamente con el agua. Algunas proteínas no colágenas ayudan a organizar y estabilizar la red de macromoléculas de la matriz, mientras que otras ayudan a los condrocitos a mantenerse unidos a esta red.

#### **1.3.2.2.1. Los colágenos**

El CA contiene múltiples tipos de colágeno genéticamente distintos [12]. Estas moléculas se disponen en redes a lo largo del tejido, confiriéndole rigidez, fuerza y cohesividad, gracias a su interacción con los PGC.

El COL II es el principal tipo de colágeno en el cartílago, ya que está presente en un 90 % a 95 % y conforma el componente más importante de las fibrillas de bandas cruzadas. Las moléculas de colágeno tipo IX tienen enlaces covalentes con las capas más superficiales de las fibrillas de banda cruzadas y se proyectan a la matriz, donde pueden formar nuevos enlaces covalentes con otras moléculas de colágeno tipo IX. Las moléculas de colágeno tipo XI tienen enlaces covalentes con moléculas de COL II y probablemente forman parte de la estructura interna de las fibrillas de bandas cruzadas. Todavía no se conoce si el colágeno IX y el XI tienen funciones específicas, pero presuntamente ayudan a formar y a estabilizar las fibras de colágeno compuestas de moléculas de COL II. Aparentemente, el colágeno tipo VI forma parte importante de la matriz que rodea inmediatamente al condrocito y lo ayuda a unirse al resto de la MEC [15, 16]. La presencia de colágeno tipo X (COL X) únicamente en las proximidades de las células de la zona calcificada del CA y de la zona hipertrófica de la placa de crecimiento, sugiere un rol en la mineralización del cartílago.

#### **1.3.2.2.2. Los proteoglucanos**

Los PGC son macromoléculas constituidas por un centro proteico con una o más cadenas de glicosaminoglicanos (GAG). Entre algunos de los GAG que se han detectado en el CA están el ácido hialurónico, el condroitín sulfato, el queratán sulfato y el dermatán sulfato. La concentración de estas moléculas varía según la región interna del cartílago, así como con la edad del individuo y la enfermedad o lesión que en él pudieran estar presentes.

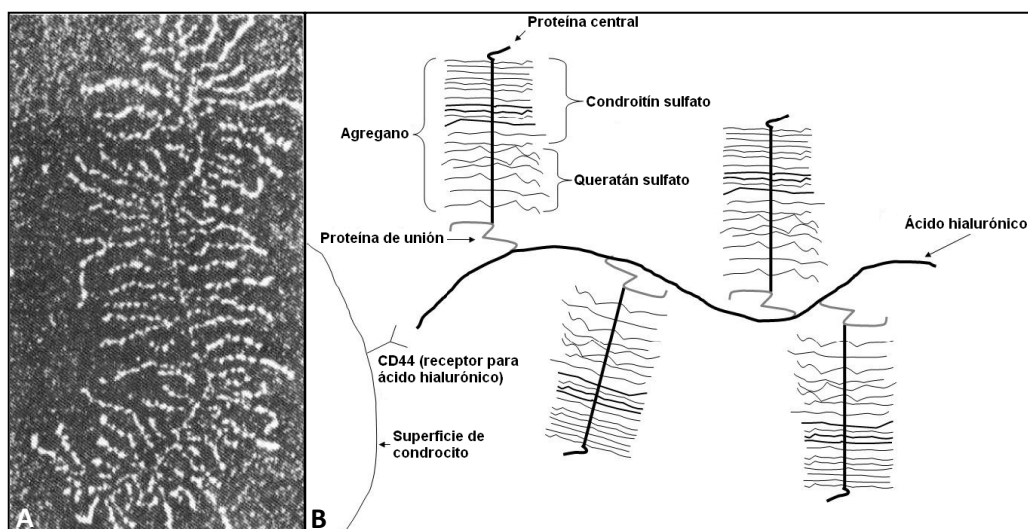
El CA contiene dos grandes clases de PGC: los grandes monómeros de PGC agregantes (agreganos) y los pequeños PGC que incluyen la decorina, el biglicano y la fibromodulina. Debido a que el colágeno tipo IX puede poseer un componente glicosaminoglicano, es considerado también como

un proteoglicano. Los agreganos poseen un gran número de cadenas de condroitín sulfato y queratán sulfato unidos a una molécula central de proteína. El cartílago también contiene grandes PGC no agregantes que parecen agreganos en estructura y composición, por lo que se ha pensado que pueden ser agreganos degradados [17].

Probablemente el cartílago contiene otros pequeños PGC que todavía no han sido identificados. Las moléculas de agreganos completan mucho del espacio interfibrilar de la matriz del cartílago, contribuyendo así a casi un 90 % de la masa total de PGC extracelulares del tejido. Los PGC largos no agregantes solo constituyen un 10 % o menos, y los pequeños PGC no agregantes conforman cerca del 3 %. Aunque los pequeños PGC contribuyen relativamente poco a la masa total de PGC del cartílago, al compararlos con los agreganos, por su pequeño tamaño podrían estar presentes en cantidades molares iguales o mayores a estos (Fig. 3).

En la matriz del CA muchos agreganos no-covalentes se asocian al ácido hialurónico (hialuronato) y a la vez se unen a proteínas (pequeñas proteínas no colágenas) para conformar agregados PGC. Estas grandes moléculas contienen una molécula central de hialuronato. La formación de estos agregados ayuda a anclar los PGC en la matriz, previniendo así su desplazamiento durante la deformación del tejido. Además, permiten organizar y estabilizar las relaciones entre PGC y la red colágena.

La pérdida de los agregados PGC parece ser uno de los cambios más tempranos asociados con la artrosis y los cambios secundarios a la inmovilización de una articulación. Además, el proceso de envejecimiento de un individuo, per se, también está asociado con la pérdida de PGC del CA [18].



**Figura 3.** Representación del proteoglicano. A) Micrografía electrónica de campo obscuro de un agregado de proteoglicanos, en el cual las subunidades de proteoglicanos y el esqueleto filamentososo se encuentran bien extendidos. B) Esquema de la estructura de un proteoglicano.

### **1.3.2.2.3. Las proteínas no colágenas y las glucoproteínas**

No se conoce tanto de las proteínas no colágenas y de las glucoproteínas como se conoce del colágeno y de los PGC. Existe una amplia variedad de estas moléculas en el CA normal, pero solo algunas pocas han sido estudiadas. En general, consisten principalmente en cadenas de aminoácidos y algunas poseen, adicionalmente, monosacáridos y oligosacáridos unidos directamente a ellas. Se cree que algunas de estas moléculas ayudan a organizar y mantener la estructura de la red macromolecular de la matriz. La ancorina C-II es una proteína de superficie unidora de colágeno que está presente en el condrocito y que le ayuda a mantenerse unido a las fibras colágenas de la matriz [19]. La proteína oligomérica del cartílago está concentrada mayormente en la matriz próxima al condrocito por lo que se sospecha que su función también es fijar la posición del condrocito en relación a la MEC. La fibronectina se encuentra presente en una variedad de tejidos, pero su función no está esclarecida todavía, aunque se sospecha que juega distintos roles en la organización de la matriz, en la interacción célula-matriz y en las respuestas del cartílago en la artritis reumatoidea y la artrosis [20].

## **1.4. Regiones del cartílago articular**

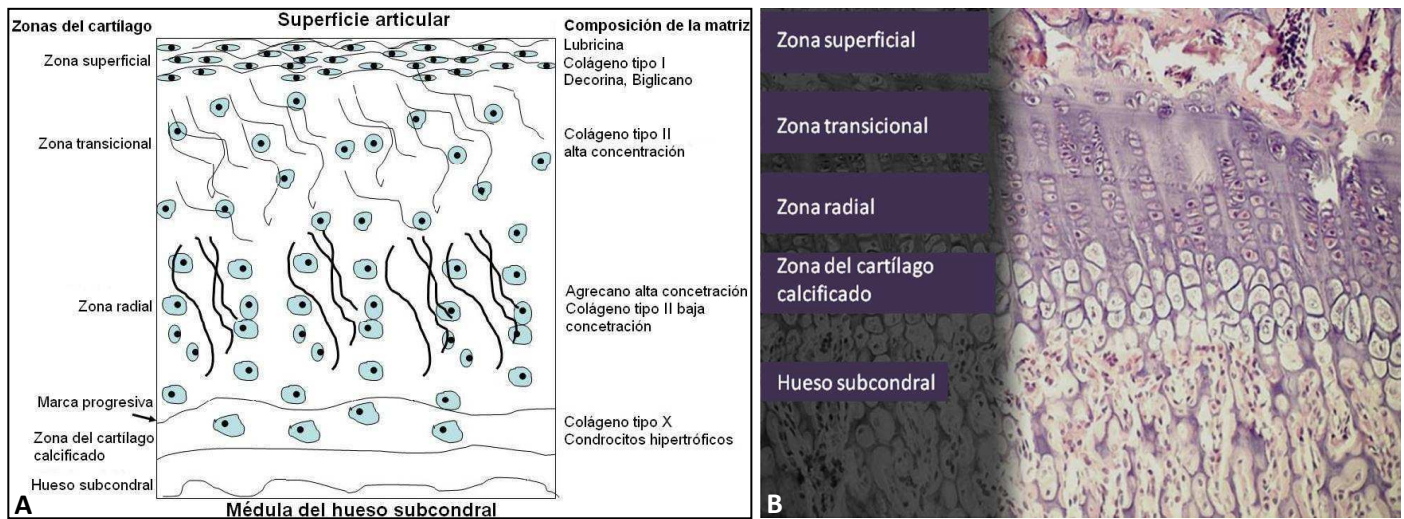
Para formar el CA, los condrocitos organizan las moléculas de colágenos, PGC y proteínas no colágenas en una estructura altamente organizada cuya composición, distribución y disposición cambia según su profundidad en el tejido y su proximidad al condrocito [14].

### **1.4.1. Las zonas del cartílago articular**

Los cambios morfológicos de los condrocitos y de la MEC desde la superficie articular hasta el hueso subcondral, hacen posible identificar en el CA cuatro capas o zonas: la zona superficial, la zona transicional, la zona media (también llamada zona radial o profunda) y la zona del cartílago calcificado [21]. El tamaño relativo y aspecto de estas zonas varían según la especie del individuo, e incluso entre las articulaciones de una misma especie, por lo que es importante no extrapolar directamente los resultados de experimentos de cartílago de una especie a otra [14]. Aunque cada zona tiene aspectos morfológicos distintos, no siempre es fácil encontrar los límites entre ellas. Sin embargo, estudios biológicos y mecánicos han demostrado que la organización zonal tiene importancia funcional [22].

Según la zona, la MEC difiere en concentración de agua, PGC y en el tamaño de los agregados. Las células, de acuerdo a la región donde se encuentren, varían en forma, tamaño, orientación relativa a la superficie articular y en actividad metabólica [22] (Fig. 4). Ellas responden distintamente a la

carga mecánica, sugiriendo que el desarrollo y mantenimiento del CA normal depende, en parte, de las variadas poblaciones fenotípicas de los condrocitos.



**Figura 4:** Organización zonal del CA. A) Esquema de la organización del CA por zonas, la orientación de las fibras de colágeno se muestran en la figura. B) Estructura del CA de cóndilo femoral medial de conejo Nueva Zelanda de ocho meses de edad. El tejido está organizado en cuatro capas o zonas: zona superficial, zona transicional, zona media o radial y zona de cartilago calcificado [14].

#### 1.4.1.1. La zona superficial

La estructura y composición de esta zona le confieren propiedades mecánicas y biológicas especiales para soportar el deslizamiento articular. Esta región está compuesta por dos capas, una superficial y otra profunda. La capa superficial recibe el nombre de lamina splendens y está conformada por finas fibras, con pocos polisacáridos y sin células. En la segunda capa, más profunda que la primera, los condrocitos poseen forma elipsoidal y se disponen de modo tal que su eje mayor es paralelo a la superficie articular. Estos condrocitos sintetizan una matriz que, en relación con las demás zonas del cartilago, tiene una baja concentración de PGC y una alta concentración de colágeno. Igualmente, las concentraciones de fibronectina y de agua son altas en estas zonas. Los cultivos celulares de los condrocitos de la zona superficial han demostrado que estos degradan más rápidamente a los PGC y sintetizan menos colágeno y PGC que lo que lo hacen sus homólogos de las zonas más profundas [23].

La densa matriz de fibrillas colágenas dispuestas paralelamente a la superficie articular en la zona superficial, ayuda a determinar las propiedades mecánicas del tejido y afecta el movimiento de moléculas hacia y desde el cartilago. Estas fibrillas confieren a esta zona una gran rigidez y resistencia en comparación con las zonas más profundas [24]. Experimentos in vitro han demostrado que la zona superficial contribuye considerablemente al comportamiento del cartilago cuando éste es comprimido [25]. Si se elimina esta zona aumenta la permeabilidad del tejido y

posiblemente aumenta la carga física de la red de macromoléculas durante la compresión. La disrupción o alteración de la matriz colágena densa de la zona superficial es uno de los primeros cambios en la degeneración experimental inducida del CA [26], lo cual sugiere que alteraciones en esta zona pueden contribuir al desarrollo de artrosis por cambio del comportamiento mecánico del tejido.

Las fibrillas de colágeno, densamente empaquetadas, crean una delgada capa que limita el ingreso y salida de grandes moléculas a la matriz celular, tal y como ocurre con los anticuerpos y otras proteínas. Por este motivo se dice que el cartílago cuenta con una barrera efectiva contra el sistema inmunológico. Estas propiedades han hecho sospechar que si se produjera la disrupción de la zona superficial, además de alterar la estructura y propiedades mecánicas del cartílago, se podría inducir una respuesta inflamatoria o inmunológica patológica [12].

#### **1.4.1.2. La zona transicional**

Como su nombre lo indica, la morfología y composición de la matriz en esta región es intermedia entre la zona superficial y la zona media. Las células en la zona transicional presentan forma esferoidal y una mayor concentración de organelos destinados a sintetizar una matriz que se caracteriza por poseer un conjunto desorganizado de fibrillas colágenas de mayor diámetro, de mayor concentración de PGC y de menor concentración de agua y colágeno, en comparación con la matriz de la zona superficial.

#### **1.4.1.3. La zona media (radial o profunda)**

Los condrocitos en la zona media poseen forma esferoidal y tienen tendencia a alinearse en columnas perpendiculares a la superficie articular. Esta zona posee las fibras colágenas de mayor diámetro en el cartílago, la mayor concentración de PGC y la menor concentración de agua. Las fibras colágenas pasan a través de la marca de agua, que es una tenue línea basófila visible a la microscopia de luz. La naturaleza de la marca de agua todavía no está esclarecida. Puede que resulte de la concentración de material basófilo calcificado en la interfase entre la matriz calcificada y la no calcificada. Otra alternativa es que se trate de una estructura matricial bien definida compuesta de una banda de fibrillas finas.

#### **1.4.1.4. La zona de cartílago calcificado**

Una delgada zona de cartílago calcificado separa la zona media de la zona de hueso subcondral. Las células de la zona de cartílago calcificado tienen un menor volumen que las zonas de la zona radial

y contienen solo pequeñas cantidades de retículo endoplasmático rugoso y de membrana de Golgi. En algunas regiones estas células parecen estar rodeadas completamente de cartílago calcificado, lo que sugiere que tienen una tasa metabólica muy baja. Walker y col. (1995) sugirieron que estas células podían jugar algún papel en el desarrollo y progresión de la artrosis [27].

#### **1.4.2. Las regiones de la matriz extracelular**

El CA también se divide en regiones, basado en la proximidad de los condrocitos. Estas regiones son llamadas: pericelular, territorial, y una interterritorial, y difieren en el contenido, diámetro y organización de las fibras de colágena [28].

Las regiones pericelulares y territoriales contienen las moléculas que unen las membranas celulares de los condrocitos a las macromoléculas de la matriz. A la vez protegen a las células del daño que pueden sufrir durante la carga y la deformación del tejido. Estas regiones también pueden ayudar a transmitir señales mecánicas del tejido cuando la matriz se deforma durante la carga articular.

##### **1.4.2.1. La región pericelular**

Las membranas celulares de los condrocitos, aparentemente, se unen al delgado borde de la matriz pericelular que cubre la superficie celular. Esta región es rica en PGC, proteínas no colágenas tales como la Ancorina C-II [19] y colágenos no fibrilares (amorfos) tales como el colágeno tipo VI [15]. En esta región es muy escaso el colágeno fibrilar.

##### **1.4.2.2. La región territorial**

En esta región se encuentran fibras colágenas delgadas que parecen adherirse a la matriz pericelular rodeando a los condrocitos, proporcionándoles protección mecánica durante la carga y la deformación del tejido. Es precisamente esta red colágena la que marca la frontera entre las matrices territoriales e interterritoriales. Sin embargo, muchas fibras colágenas interconectan a las dos regiones haciendo difícil, en ocasiones, identificar los límites entre ellas.

##### **1.4.2.3. La región interterritorial**

La matriz interterritorial constituye la mayor parte del volumen del CA maduro y contiene las fibrillas colágenas de mayor diámetro. A diferencia de las fibras colágenas de la matriz territorial, estas fibras no rodean al condrocito y cambian noventa grados de orientación en relación a la superficie articular, desde la zona superficial hasta la zona radial. En la zona superficial las fibrillas tienen un diámetro relativamente pequeño y generalmente se encuentran paralelas a la superficie



articular. En la zona transicional las fibrillas asumen ángulos más oblicuos que en la zona superficial y en la zona radial se disponen, en su mayoría, perpendicularmente a la superficie articular.

### **1.5. Interacciones entre los condrocitos y la matriz**

La relación entre los condrocitos y la matriz hace posible el mantenimiento del cartílago a lo largo de la vida del individuo. La matriz protege a los condrocitos del daño mecánico durante el uso normal de la articulación, ayudando a mantener su forma y fenotipo. Nutrientes, substratos para la síntesis de las moléculas de la matriz, moléculas recientemente sintetizadas, moléculas matriciales degradadas, productos de desecho metabólico y moléculas que ayudan a regular el funcionalismo celular, tales como citocinas y factores de crecimiento, pasan a través de la MEC y en algunos casos pueden ser almacenadas allí. Los tipos de moléculas que pueden pasar a través de la matriz, así como la tasa a la cual lo hacen, dependen de la composición y organización de la matriz, principalmente por la concentración, composición y organización de los grandes PGC.

A lo largo del ciclo vital, los condrocitos degradan y sintetizan las macromoléculas de la matriz. Los mecanismos que controlan el equilibrio entre estas actividades permanecen poco comprendidos hasta ahora, pero se cree que hay citocinas con efectos anabólicos y catabólicos que juegan roles importantes [29]. Por ejemplo, la interleucina-1 induce la síntesis de proteasas capaces de degradar las macromoléculas de la matriz e interferir con la síntesis de PGC a nivel transcripcional. Otras citocinas se oponen a actividades catabólicas estimulando la síntesis de matriz y la proliferación celular. En respuesta a una variedad de estímulos, los condrocitos sintetizan y liberan estas citocinas a la matriz, donde se unen a receptores de las superficies celulares (de la misma célula o sus vecinas) o simplemente permanecen en la matriz.

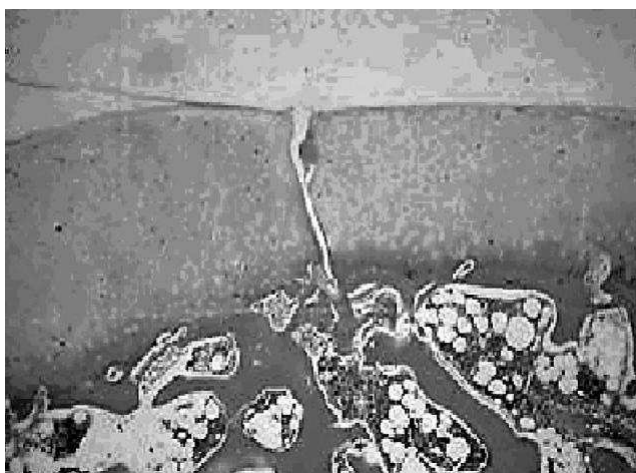
La MEC también actúa como un transductor de señal para los condrocitos. Esta trasmite las señales que resultan de la carga mecánica de la superficie articular a los condrocitos y estos responden alterando la composición de la matriz [30].

Los detalles de cómo la carga articular influyen en la función de los condrocitos permanecen todavía desconocidos, pero se sabe que la deformación de la matriz produce efectos físicos, químicos y eléctricos que pueden influenciar a estas células, produciendo la circulación de fluido tisular que induce cambios en los flujos de nutrientes, metabolitos, e iones a través de la matriz. Del mismo modo, la carga también puede causar cambios persistentes en la organización molecular de la matriz, alterando la respuesta de los condrocitos. Por lo tanto, la matriz no solo traduce y

transmite señales, también puede registrar la historia de la carga física del tejido y alterar la respuesta de las células sobre la base de la historia de esa carga [14].

## **1.6. Obstáculos en la reparación fisiológica del cartílago articular**

La escasa capacidad regenerativa del CA se conoce desde los tiempos de Hipócrates [31], pero fue Hunter (1743) quien describió explícitamente que las lesiones en el CA no curaban espontáneamente [32] (Fig. 5). Según Shortkroff y col. (1996), los factores relacionados con la ineficiente reparación del CA son múltiples y pueden clasificarse en tres grupos: factores vinculados a la anatomía del tejido, factores inherentes a los condrocitos y factores relacionados a la MEC [33].



**Figura 5:** Debido a la escasa capacidad de regeneración del CA, las lesiones de todo el espesor del tejido no son capaces de curarse espontáneamente y tienden a degenerar, probablemente hacia la artrosis.

### **1.6.1. Factores vinculados a la anatomía del cartílago articular**

El CA carece de nervios, vasos sanguíneos y linfáticos, lo cual lo sitúan en una verdadera condición de aislamiento con el resto del organismo. En caso de producirse una lesión no hay forma de comunicar su presencia a los demás órganos, hasta que ocurra una irritación sinovial.

Agentes químicos inyectados dentro de una articulación, como los utilizados para el tratamiento de enfermedades sinoviales, pueden tener efectos adversos sobre el cartílago, pero la ausencia de terminaciones nerviosas previene el reconocimiento de la lesión. Del mismo modo, la ausencia de elementos vasculares impide que se establezca una reacción inflamatoria ante un traumatismo, por lo que en estos casos no estará presente esta fase crucial del proceso de reparación. El aislamiento

del cartílago se agrava todavía más si se recuerda que los nutrientes de los condrocitos deben vencer la doble barrera fisiológica antes de alcanzar a estas células.

#### **1.6.2. Factores inherentes a los condrocitos**

La baja densidad de células en el CA en comparación con otros tejidos, influye directamente en su capacidad de regeneración, pues son estas las encargadas de mantener las propiedades de la red de macromoléculas de la MEC. La limitada actividad mitótica de los condrocitos del cartílago adulto y su bajo número de células precursoras en la médula ósea (MO), son otros de los factores que inciden desfavorablemente en este sentido.

#### **1.6.3. Factores relacionados con la matriz extracelular**

Debido a las cargas eléctricas de la red de macromoléculas y a la presencia de fibras de colágenos en los aspectos más superficiales de la MEC, se obstaculiza la migración de moléculas y enzimas que podrían favorecer el remodelado interno del cartílago.

#### **1.6.4. Respuesta del cartílago articular a las lesiones mecánicas**

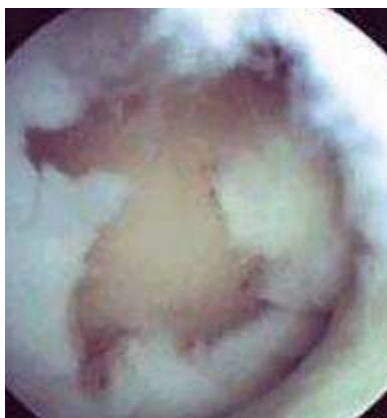
En lesiones mecánicas limitadas a la sustancia del tejido cartilaginoso (lesiones condrales), la respuesta del tejido carece de un componente inflamatorio por la falta de red de capilares. La reacción, independientemente de su extensión, se caracteriza por un aumento de la actividad metabólica de los condrocitos próximos a los bordes de la lesión y un relativo aumento del comportamiento mitótico de los mismos. Esta actividad, está vinculada con modificaciones en la tasa de síntesis de componentes de la matriz, tal y como Moskowitz y col. (1981) demostraron con sus experimentos de captación de  $^{35}\text{SO}_4$  (como indicador de la síntesis de glucosaminoglicanos) y de  $^3\text{H}$ -glicina (como indicador de la síntesis de proteínas). Este proceso reparativo es muy limitado, poco eficiente y al cabo de una semana los niveles de captación de los marcadores radiactivos son equivalentes a los encontrados en tejidos no lesionados [34].

En lesiones más profundas, donde se afecta la placa ósea subyacente al tejido cartilaginoso (lesiones osteocondrales), la respuesta inflamatoria es mayor y está mediada por la red vascular del hueso. El efecto de esta respuesta del organismo, es similar a la que ocurre en otros tejidos vascularizados. Inicialmente, el defecto es ocupado por sangre que se organiza en un coágulo fibroso englobando

eritrocitos, plaquetas y elementos celulares de la MO. Las células indiferenciadas se transforman en fibroblastos que junto a la red capilar creciente van produciendo, dentro del coágulo de fibrina, un tejido granuloso reparativo. Con la fibrosis progresiva, el defecto queda ocupado con una cicatriz laxa en aproximadamente diez días, la cual se va haciendo paulatinamente menos vascularizada y más esclerótica. Finalmente se produce una masa fibrocartilaginosa que rellena y une firmemente los bordes de la lesión original.

### 1.7. Historia natural de las lesiones del cartílago articular

Debido a la falta de innervación del cartílago, una lesión aislada en este tejido no produce dolor. Por lo tanto, los pacientes desconocen su situación, no acuden al médico y no se documenta la historia natural de las lesiones condrales (Fig. 6).



**Figura 6:** Lesiones del cartílago como la que muestra esta fotografía son asintomáticas a menos que haya afectación de estructuras próximas innervadas.

Aunque existen pocas evidencias en la literatura médica sobre la relación entre el daño del CA y el desarrollo de artrosis, muchos investigadores han asumido que las lesiones del cartílago se originan durante la actividad física cotidiana o deportiva y progresan tempranamente hasta la artrosis por los efectos de sobrecarga y fricción que se generan en las superficies articulares [35].

El conocimiento actual de la historia natural de las lesiones del CA se debe en gran parte a los estudios experimentales y en humanos de la artrosis fémoro patelar, así como del seguimiento de pacientes con osteocondritis disecante [36].

Los trabajos de Ficat (1973, 1979), con microscopía electrónica de barrido, sobre la condropatía post-contusiva en patelas de conejos y de humanos, le permitió concluir que existían varias fases de la enfermedad, reflejada en fenómenos macro y microscópicos. A nivel macroscópico Ficat (1979)

describió que ocurría: 1. Edema: fenómeno prácticamente inmediato y constante a la contusión y que el autor pensaba que disminuía espontáneamente después del sexto mes. 2. Fisura: es inmediata en muchos de los casos, no cura. 3. Ulceración: es consecuencia de la de la degeneración de la fisura. A nivel microscópico describió: 1. Fisura: puede ser parcial o total en relación a la profundidad del tejido. 2. Los condrocitos de la capa superficial: tienden a desaparecer y tienen aspecto preneocrótico y degenerativo. 3. Deterioro de las fibras de la matriz [37, 38].

Otros estudios que han aportado conocimiento sobre la artrosis son los de osteocondritis disecante. Según Insall y col (1993) la osteocondritis disecante es un proceso en el cual un segmento de cartílago, junto a hueso subcondral, se separa de una superficie articular. Suele ocurrir en el cóndilo femoral medial de personas jóvenes, de preferencia atletas. Su origen se debate entre los que piensan que puede tener exclusivamente un origen vascular con necrosis ósea [39], y los que apoyan, además de esta hipótesis, el antecedente traumático como evento inicial [40].

Linden encontró que el 55 % de los adultos que sufrían de osteocondritis disecante, al cabo de 33 años de seguimiento, presentaban artrosis. Pero ninguno de los niños de esta serie presentó artrosis al cabo del mismo tiempo. Esto hizo concluir al investigador que la reparación de la lesión de la osteocondritis disecante era más eficiente en los niños que en los adultos [41].

### **1.10. Prevalencia e incidencia de las lesiones condrales**

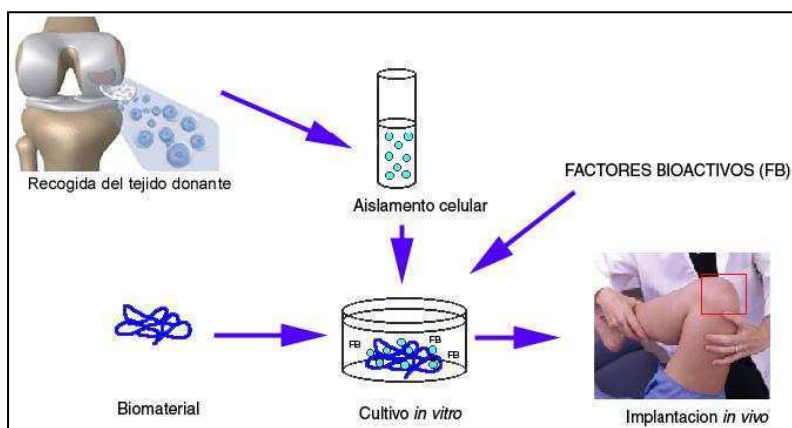
Por ser asintomáticas, no existen estimaciones precisas de la prevalencia e incidencia de las lesiones condrales en la población en general. Widuchowski y col (2007) presentaron una revisión de 25,124 artroscopías evidenciando más de 53,000 lesiones del cartílago en casi 20,000 pacientes con un promedio de 2.7 lesiones por rodilla. En este grupo, el 9.7 % de los pacientes presentaba reblandecimiento del CA en alguna región, lo cual da una idea del número de lesiones de diagnóstico casual que pueden estar presentes en pacientes con otros síntomas en la rodilla [42].

### **1.11. Ingeniería del tejido cartilaginoso**

La ingeniería de tejidos (IT) es una ciencia multidisciplinar emergente, que se destaca como una nueva área de la medicina y puede ser definida como el arte de reconstruir los tejidos, ya sea estructural, o funcionalmente [43]. El desarrollo del concepto de la IT como solución para la reparación cartilaginosa fue propuesto por primera vez por el Dr. W. T. Green en la década de los 70s, cuando intentó implantar condrocitos en la rodilla de conejo. En este caso, los condrocitos

crecen en un ambiente *ex vivo* que puede ser transplantado en un defecto cartilaginoso. Con este estudio se concluyó que con el uso de un biomaterial de calidad sería posible generar nuevo tejido implantable [44].

Este nuevo campo de la ciencia tiene por bases el uso combinado de células, biomateriales y factores bioactivos que permiten regenerar y reemplazar las funciones biológicas del cartílago dañado o degenerado (Fig. 7).



**Figura 7.** Esquema de ingeniería de tejidos.

A pesar de que en las últimas cuatro décadas se han desarrollado muchas técnicas, ninguna de ellas ha sido capaz de lograr una regeneración de forma eficaz del cartílago hialino. El tipo celular utilizado es uno de los puntos decisivos en el desarrollo de esta ingeniería. Se han investigado diferentes poblaciones celulares en estudios experimentales como condrocitos maduros, y células madre [45]. A continuación se describen los diferentes componentes necesarios en la IT del cartílago: las células, sustancias bioactivas y matrices.

### **1.2.1. Células utilizadas en ingeniería del tejido cartilaginoso**

Las células utilizadas en IT deben ser biosintéticamente activas y tener disponibles nutrientes, metabolitos y otras moléculas reguladoras [46]. La edad del donante, el origen y el estado de diferenciación de las células son factores fundamentales que pueden variar los resultados obtenidos en los estudios realizados hasta la fecha [14]. En el organismo de los mamíferos adultos existe un número aceptable de células condroprogenitoras, que tienen el potencial de diferenciarse en condrocitos, formando tejido cartilaginoso, y que pueden ser utilizados en IT [47], dentro de éste grupo podemos incluir: los condrocitos y las células madre.

#### **1.2.1.1. Condrocitos y condroblastos.**

Los condrocitos maduros y diferenciados son a priori la primera elección para la regeneración cartilaginosa por ser la población celular nativa del cartílago y sintetizar los componentes propios de la matriz [48]. Los condrocitos se aíslan fácilmente, pero es complicado obtener un número apropiado de células con capacidad para regenerar el cartílago completo [49]. Es posible expandir in vitro las poblaciones celulares usando técnicas de cultivos celulares, sin embargo, se observó que en monocapa los condrocitos se desdiferencian, toman una apariencia fibroblástica y secretan una matriz fibrosa [50]. Se ha demostrado que el cultivo de células en un medio tridimensional, como una matriz tridimensional porosa puede ayudar a mantener el fenotipo condrocítico [51].

### 1.2.1.2. Células madre

Las células madre (CM) son las formadoras de cada órgano, tejido y células del cuerpo. Estas células tienen como principales características el ser células indiferenciadas, capaces de dividirse y autorenovarse durante largos períodos, formando unidades formadoras de colonias fibroblásticas (CFU-F), y poseen el potencial de diferenciarse en diversas líneas celulares [52].

Las CM pueden clasificarse en relación con su plasticidad y en función al origen (Tabla 1). La plasticidad puede ser definida como la capacidad para diferenciarse en células especializadas y pueden ser denominadas como totipotentes, pluripotentes y multipotentes. En cuanto al origen de estas células pueden clasificarse como células embrionarias y células adultas (post-nacimiento).

**Tabla 1.** Resumen de la clasificación de las células madre.

Origen	Plasticidad		Localización
<b>Embrionarias</b>	Totipotentes	Potencial de transformarse en cualquier tipo de células del cuerpo adulto y en cualquier célula de las membranas extraembrionarias (ej. placenta).	Cigoto y las primeras 4 blastómeras durante la segmentación.
	Pluripotentes	Capaces de transformarse en cualquier célula diferenciada del organismo, pero no pueden formar las membranas extraembrionarias (que derivan del trofoblasto).	Todas las otras células embrionarias, excepto el disco embrionario y las primeras 4 células.
<b>Adultas</b>	Multipotentes	Capacidad de diferenciarse en varios tipos celulares.	Periostio, pericondrio, hueso trabecular, tejido adiposo, sinovia, músculo esquelético, pulmón, dientes deciduos, cerebro, dermis, hígado, páncreas, cordón umbilical.

### 1.2.1.2.2. Células madre adultas

Estas células se denominan frecuentemente células madre mesenquimatosas (CMM) o células madre estromales (Alhadlaq y Mao, 2004). Poseen una mayor capacidad proliferativa y potencial regenerativo comparadas con las células somáticas maduras. Pueden encontrarse en la mayor parte de los órganos del cuerpo en los cuales pueden sustituir las células muertas y lesionadas (Baksh et al., 2004). Las CMM demostraron ser multipotentes con capacidad para diferenciarse en células de músculo, hueso, cartílago y grasa (Pittinger et al., 1999). Las CMM son altamente replicativas y menos tumorogénicas que sus homólogas embrionarias, aunque el uso de células madre embrionarias (CME) en lugar de las CMM para regenerar el cartílago, tiene la ventaja de que las CME son inmortales y pueden, teóricamente, proporcionar una fuente ilimitada de condrocitos diferenciados. En cambio, la renovación y capacidad proliferativa de las CMM disminuye con la edad (Baksh et al., 2004). Ésto obviamente, limita el uso y el trasplante de células autólogas en el tratamiento de enfermedades degenerativas relacionadas con la edad, como la osteoartritis. Las CMM pueden tener más anomalías genéticas que las CME, causadas por las exposiciones a tóxicos metabólicos y errores en la replicación del DNA acumulados durante la vida del individuo.

### **Localización de las células troncales multipotentes en los tejidos adultos**

Las células madre fueron identificadas por primera vez en los estudios pioneros de Friedenstein y Petrakova, en el interior del compartimento estromal de la médula ósea en 1966. La médula ósea contiene dos tipos de células madre, las células madre hematopoyéticas, que dan origen a las células sanguíneas y del sistema inmunitario (Kondo et al., 2003) y las células estromales progenitoras, ahora denominadas CMM, que tienen la capacidad de originar una gran diversidad de tejidos. Hasta hace poco tiempo, la médula ósea era el tejido de elección para la obtención de CMM adultas, sin embargo, trabajos recientes han publicado nuevas fuentes de CMM adultas concretamente: periostio (Zarnett y Salter, 1989; Nakahara et al., 1990; O'Driscoll et al., 2001; Fukumoto et al., 2003), pericondrio (Arai et al., 2002), hueso trabecular (Noth et al., 2002; Sottile et al., 2002; Tuli, 2003a), tejido adiposo (Zuk et al., 2001; De Ugarte, et al., 2003), sinovia (De Bari et al., 2001; Sakaguchi et al., 2005; Park et al., 2005b; Kurth et al., 2007), músculo esquelético (Deasy et al., 2001), pulmón (Lama et al., 2007) dientes deciduos (Miura et al., 2003), cerebro (Kukekov et al., 1999; Hirsch y Zupanc, 2006), dermis (Ferraris et al., 2000), hígado (Malouf et al., 2001), páncreas (Abraham et al., 2002), cordón umbilical (Carlin et al., 2006). Actualmente, los lugares ideales para la recogida y aislamiento de células troncales adultas permanecen bajo una cierta controversia. A pesar de que las células de la médula ósea han sido las más estudiadas y mejor conocidas, las células obtenidas de otros lugares están ocupando un papel cada vez más relevante. Dentro de ellas las obtenidas del



tejido adiposo, debido a su relativa facilidad de obtención y que no existen diferencias significativas de morfología, rendimiento, inmunofenotipo, cinética de crecimiento, senescencia celular, tasa de aislamiento, capacidad de diferenciación y eficiencia de transducción genética en relación con las células provenientes de la médula ósea y cordón umbilical (De Ugarte et al., 2003; Kern et al., 2006; Wagner et al., 2005; Izadpanah et al., 2006). Además, los aspirados de médula ósea tienen problemas asociados, que pueden ir desde que una porción muy pequeña de células de médula ósea (1 en cada 100 000) pueda ser considerada una verdadera CMM, la infección de la herida y las complicaciones potenciales de sepsis (Frazer et al., 2006).

Las CMM derivadas de tejido adiposo fueron estudiadas principalmente para determinar su potencial adipogénico (Deslex et al., 1987; Zuk et al., 2001; Dicker et al., 2005), pero más recientemente estas células han demostrado tener también potencial para diferenciarse en cartílago (Zuk et al., 2001; Erickson et al., 2002; Winter et al., 2003; Awad et al., 2004), células endoteliales (Miranville et al., 2004; Wosnitza et al., 2007), soporte hematopoyético (Cousin et al., 2003), hepatocitos (Seo et al., 2005), células neuronales (Ashjian et al., 2003; Kang et al., 2003; Safford et al., 2002), músculo esquelético (Mizuno et al., 2002; Bacou et al., 2004), músculo cardíaco (Rangappa et al., 2003; Gaustad, et al., 2004; Planat-Benard et al., 2004) y osteoblastos (Zuk et al., 2001; Zuk et al., 2002; Huang, et al., 2002; Cowan et al., 2004), cuando son tratadas con medios de diferenciación específicos. La obtención de CMM derivadas del tejido adiposo es más sencilla que las de médula ósea, y con técnicas mínimamente invasivas, estas células presentan gran plasticidad y existen en mayor cantidad que en la médula ósea (Wexler et al., 2003; Wagner et al., 2005; Kern et al., 2006).

Para que las CMM derivadas de tejido adiposo puedan ser utilizadas rutinariamente como agentes de terapia celular, es necesario que sean caracterizados los parámetros que definen esta población celular. De esta forma, diversos autores han procurado estudiar la presencia de varios marcadores de superficie celular, utilizando numerosos anticuerpos monoclonales (Barry y Murphy, 2004; Gomillion y Burg, 2006).

### **1.2.2. Sustancias bioactivas en la diferenciación condrocítica**

La condrogénesis está regulada por una red multifactorial de vías metabólicas. Esta red puede ser influenciada por un conjunto de citocinas, hormonas y factores de crecimiento, que tendrán un papel fundamental en el desarrollo del tejido a implantar (Risbud y Sitterling, 2002; Raghunath et al., 2005). Debido a que el proceso de condrogénesis está tan interconectado con la osteogénesis, muchas de las citocinas y factores de crecimiento que inducen la diferenciación condrocítica, están,

de algún modo, implicados en la diferenciación osteogénica (Mastrogiacomo et al., 2001; Shea et al., 2003). Tenemos, por tanto, el desafío de optimizar la combinación de las sustancias bioactivas dirigiendo la diferenciación hacia la línea condrogénica, evitando la aparición de efectos pleotrópicos no específicos, que pueden ser atribuibles a la activación de múltiples vías de señalización intracelulares (Freench y Athanasiou, 2003; Heng et al., 2004; Galois et al., 2005).

Cuando intentamos usar las células madre para la reparación cartilaginosa in vitro, es importante el desarrollo de protocolos bien definidos y eficientes para mantener el fenotipo condrocítico o la diferenciación de las células madre en una línea condrogénica estable.

A continuación se describe la influencia de las principales sustancias en la diferenciación condrocítica (Tabla 10), y su posible utilización en ingeniería del tejido cartilaginoso.

### **Superfamilia TGF- $\beta$**

Esta superfamilia está constituida por numerosos factores de crecimiento y de diferenciación, siendo algunos de vital importancia en la condrogénesis como los factores de crecimiento y transformación beta (TGF- $\beta$ s) y proteínas morfogenéticas óseas (BMPs).

#### **TGF-Bs**

Los TGF- $\beta$ s son factores de crecimiento peptídicos que se expresan en el cartílago, por lo menos en tres isoformas ( $\beta$ 1,  $\beta$ 2 y  $\beta$ 3) (Frazer et al., 1991). Son moléculas multifuncionales, capaces de regular una gran variedad de procesos celulares incluyendo el crecimiento, la diferenciación, la síntesis de matriz extracelular, la degradación, la inflamación y la reparación de los tejidos (Sporn et al., 1987). La expresión de TGF- $\beta$ 1 está restringida a la zona proliferativa y pre-hipertrófica del cartílago. El TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3 se expresan en todo el cartílago de la placa de crecimiento y con más intensidad en la zona hipertrófica y mineralizada, (Horner et al., 1998). Un aspecto interesante de la superfamilia TGF- $\beta$  es la modulación de su actividad por las proteínas de la matriz extracelular como el biglicano, fibromodulina, decorina y endogлина. Estas proteínas funcionan como reguladores fisiológicos de la biodisponibilidad del TGF- $\beta$  (Hildebrand et al., 1994). Se ha demostrado que el TGF- $\beta$ 1 estimula la producción de fibronectina y de sus receptores que, a su vez, actúan como moléculas de adhesión y activan las MAC y las caderinas (N-CAD), promoviendo la formación de las condensaciones de células pre-condrogénicas (Hall y Myaki, 1995). Se sabe que el TGF- $\beta$ 1, provoca un aumento del mRNA del colágeno tipo II y de los proteoglicanos, promoviendo la diferenciación cartilaginosa de las CMM (Kulyk et al., 1989; Erickson et al., 2002).

## **BMPs**

El nombre por el cual son denominadas estas proteínas tiene origen en el hecho de que han sido originalmente descubiertas en el hueso, a pesar de que actualmente, se conozca que están implicadas en el desarrollo de muchos tejidos: corazón, cartílago, timo, bazo e intestino. Hasta el momento se han identificado varios miembros de esta familia de proteínas glicosiladas, que se encuentra dividida en grupos, de acuerdo con su homología en la terminación carboxilo. Una de las razones que explican la gran diversidad de los efectos observados con las BMPs, tienen que ver con la existencia de varios receptores para estas proteínas. Estos receptores transmembranares de serina-treonina están conectados a una quinasa, y pueden ser de dos tipos I ó II (ten Dijke et al., 1994; Noho et al., 1995). Muchas BMPs, demostraron ser capaces de inducir la condrogénesis o la formación ósea, solas o en combinación presentes en las condensaciones mesenquimatosas antes del desarrollo cartilaginoso (King et al., 1994). Las BMP-5 están presentes en las condensaciones mesenquimatosas antes del desarrollo cartilaginoso (King et al., 1994) y las BMP-2 y BMP-4, parecen tener la capacidad para desencadenar la diferenciación de células mesenquimatosas en condrocitos, inhibiendo la diferenciación miogénica (Duprez et al., 1996). La BMP-2 es capaz de aumentar la producción de colágeno tipo II y agregano en los condrocitos articulares (Grunder et al., 2004). La BMP-6 induce la sobreexpresión de agregano-1 y la cadena  $\alpha 1$  del colágeno tipo II. Parece ser un importante factor a utilizar en la ingeniería del tejido cartilaginoso. Células transfectadas con BMP-7 (OP-1) muestran una acelerada remodelación cartilaginosa en modelos animales (Raghuath et al., 2005), y también parece tener influencia en la diferenciación condrocítica, promoviendo la expresión de agregano a los 14 días (Knippenberg et al., 2006) y estimulando la síntesis de la matriz (COL II). Esta BMP es capaz de frenar procesos catabólicos inducidos por la IL-1, como la inducción de metaloproteasas (MMP 1 y 13) y la supresión de la infiltración fibroblástica (Saas et al., 2006). Uno de los problemas asociados con la adición de las BMP, es que estimula la producción de marcadores específicos de hipertrofia de los condrocitos (Chimal-Monroy et al., 2003). Por su parte, el TGF-  $\beta 1$  está asociado al tratamiento con BMP-2, ésto lleva a la formación de una MEC abundante y una inhibición de la hipertrofia.

## **Factor de crecimiento tipo insulina (IGF)**

Los IGF-I y -II son polipéptidos hormonales de cadena sencilla que intervienen en la proliferación y diferenciación celular. Sus efectos mitogénicos parecen estar regulados por el receptor IGF tipo I. En los fluidos extracelulares, los IGFs se presentan unidos a sus proteínas de conexión (IGFBPs), que modulan su acción (Jones y Clemmons, 1995). Varios trabajos evidencian que estos factores,

sus receptores y las IGFBPs se expresan en los condrocitos y por vía autocrina/paracrina regulan la proliferación de estas células, considerándose el mayor factor anabólico que existe en el cartílago adulto (McQuillan et al., 1986; Kleffens et al., 1999; Fukumoto et al., 2003). McQueen y Dealy, en 2001, observaron que existe una coexpresión entre el IGF-I y la IGFBP2 en el núcleo central de las condensaciones formadas en el inicio de la condrogénesis, pensándose que tiene un papel importante en la formación inicial de las condensaciones pre-condrogénicas de los miembros, verificándose que por la administración de IGF-1 de forma exógena se promovía la diferenciación condrogénica y la síntesis de matriz. La IGF-I modula la condrogénesis de las CMM, estimulando la proliferación, regulando la apoptosis celular e induciendo la expresión de marcadores condrocíticos. Este factor tiene un efecto sinérgico con elementos de la familia TGF- $\beta$ , en la condrogénesis de las células progenitoras (Fukumoto et al., 2003; Longobardi et al., 2006).

#### **Factor Básico de Crecimiento Fibroblástico (bFGF)**

El bFGF es un agente mitogénico que estimula la proliferación de los condrocitos. El bFGF favorece la confluencia de condrocitos y la síntesis de una MEC cartilaginosa in vitro. El bFGF puede producir, igualmente un factor inhibidor sobre la diferenciación terminal de los condrocitos y sobre la osificación (Kato y Iwamoto, 1990; Loeser et al., 2005).

También se demostró que el bFGF conduce a la síntesis de varias proteínas condrocíticas incluyendo las metaloproteinasas -1 y 3, las inhibidoras tisulares de las metaloproteinasas-1 y la glicoproteína 38, sugiriendo que este factor tiene un papel importante en la remodelación cartilaginosa (Vincent et al., 2002).

#### **1.11.1.2.6. Matrices para la reparación del cartílago**

A pesar de los resultados prometedores obtenidos con las técnicas anteriormente descritas, no se deben menospreciar algunas de las complicaciones o inconvenientes que se les atribuyen (el volumen de tejido de reparación necesario, la morbilidad de la zona donante o la dificultad para cubrir exactamente el área lesionada de cartílago). La IT de los compuestos sintetizados in vitro, está encaminada a evitar estas limitaciones. Los soportes o matrices macroporosas de biomateriales proporcionan a las células condrogénicas un alojamiento temporal en el que sobreviven, se multiplican, y producen MEC para constituir el cartílago regenerado. Estos biomateriales actúan como un vehículo de transferencia celular y por lo tanto, deben de ser biocompatibles con el tejido primitivo sobre el que se produzca la lesión (y por ende, con el tejido de alrededor de la zona en la que se implante la matriz biosintética). Algunas sustancias naturales son adecuadas como

transportadoras celulares en el andamiaje para la IT del cartílago. Entre éstas, destacan la fibrina, la agarosa, el alginato, el colágeno, el quitosan o el ácido hialurónico. Muchos de estos compuestos son hidrogeles y se diseñan como inyectables en su forma líquida, mezclándose adecuadamente con las células condrogénicas. Una vez inyectadas en la zona receptora, estas sustancias tienden a rellenar cualquier defecto cartilaginoso sea cual sea su forma y tamaño [53].

La fibrina es el componente más abundante de los coágulos sanguíneos. Puede utilizarse como adherente para otros cartílagos sintetizados mediante IT, como relleno de defectos condrales, como soporte propiamente dicho o como factor de crecimiento. Sus aplicaciones son limitadas teniendo en cuenta sus menores propiedades mecánicas, la posibilidad de provocar respuestas inmunes o inflamatorias y las dificultades para atraer células huésped [54]. La agarosa y el alginato poseen mejores características de resistencia mecánica que la fibrina. Sin embargo, no son lo suficientemente resistentes para absorber las fuerzas de fricción durante la movilidad articular en los animales de experimentación grandes y el organismo no las llega a reabsorber satisfactoriamente [55]. Algunos componentes propios del CA como el colágeno, son los más biocompatibles y los menos inmunogénicos. Las esponjas de colágeno se han utilizado en numerosos estudios junto con condrocitos y células madre mesenquimales para formar cartílago tanto *in vitro* como *in vivo* [56]. Sin embargo, el colágeno únicamente puede extraerse de organismos vivos, lo que encarece su utilización y conlleva un potencial riesgo de transmisión de enfermedades por priones, sobre todo en los colágenos de origen bovino. Además, los condrocitos humanos cultivados en contacto con tantas proteínas de origen animal, pueden expresar moléculas inductoras de una respuesta inmune, poniendo así en peligro la viabilidad del tejido implantado. El ácido hialurónico es un componente del líquido sinovial de las articulaciones y de la MEC del cartílago, que también se ha utilizado para la IT del cartílago [57]. Otras sustancias ajenas a los tejidos articulares como el polisacárido quitosan, desencadenan una respuesta inflamatoria teóricamente escasa. Se ha logrado sintetizar en forma de líquido inyectable que se transforma en gel a temperatura corporal [58]. Los soportes poliméricos sintéticos poseen las ventajas de la fiabilidad del origen de los polímeros y de la reproducibilidad de su síntesis mediante IT, los polímeros más utilizados son los poli- $\alpha$ -hidroxi ésteres, especialmente el ácido poliláctico (PLA) y el ácido poliglicólico (PGA), están aprobados para su uso clínico y presentan mejores características mecánicas que las sustancias naturales, lo que los hace mucho más fáciles para colocarlos en el defecto cartilaginoso y más resistentes a las fuerzas de fricción durante los movimientos articulares. Los copolímeros de estas dos sustancias consiguen disminuir la tasa de degradación del implante, este hecho es importante, ya que el tiempo de permanencia del polímero implantado debe de ser suficiente para conseguir el objetivo del

soporte tridimensional y no ser excesivo para no alterar la regeneración tisular [59]. Además del contenido del soporte, el diseño de la arquitectura del mismo puede condicionar su colonización celular. Teniendo en cuenta que la MEC del CA normal se distribuye de forma poco homogénea, con los condrocitos cerca de la unión osteocondral y las fibras de colágeno a lo largo de la superficie articular, la arquitectura del andamiaje deberá ser como la del tejido cartilaginoso para favorecer el crecimiento de los condrocitos presembrados [60]. Los condrocitos u otras células de inducción condrogénica presembrados en las matrices biosintéticas, deben ser capaces de formar MEC para constituir el neocartílago. Para facilitar la viabilidad celular de los condrocitos en la estructura sintetizada, se han diseñado biorreactores que aseguran factores físicos, químicos y biológicos en el entorno de los condrocitos. Entre estos factores destacan la fricción a consecuencia de la movilidad en la superficie articular, el estrés en compresión, la presión de oxígeno, la fuerza hidrostática y, por último, la estimulación mecánica dinámica [61].

Las células madre mesenquimales (CMMs) de la MO pueden ejercer algunas de las funciones de las células cartilaginosas en los casos de condrocitos autólogos insuficientes. Para ello, se requieren una serie de factores que favorezcan que las CMMs adquieran una actividad condrogénica. Para promover esta condrogénesis se añaden diferentes citocinas y factores de crecimiento a los medios de cultivo celulares. Entre estas sustancias destacan varias isoformas de TGF- $\beta$ , la activina, la proteína osteogénica 1, el factor de crecimiento a fibroblásto (FGF) 2, el IGF-1, la prolactina, la IL 1- $\beta$ , el Cyr-61, la hormona del crecimiento, el factor de crecimiento y diferenciación (GDF) 5, la BMP-2 y la BMP-4 [62]. Otros factores químicos no proteicos como las prostaglandinas D2 y F2  $\alpha$  [63]; las prostaglandinas E1 y E2 [64]; la hormona tiroidea [65]; la 1.25 hidroxí-vitamina D [66]; el ácido ascórbico [67]; la dexametasona [68]; el etanol [69]; la estaurosporina [70]; el dibutilil cAMP2 [71]; la concavalina A [72] y, por último, el vanadato [73] han demostrado inducir la condrogénesis. Estos compuestos químicos son menos lábiles y tiene una vida media mayor que los factores proteicos, favoreciendo así los cultivos in vitro durante varias semanas.

#### **1.11.1.2.7. Terapia génica y terapia celular con células madre.**

Evans y Robbins (1995) proponen la aplicación de la transferencia génica (TG) al CA para el tratamiento de los problemas degenerativos articulares [74]. La terapia génica es una técnica basada en la alteración de la información de los genes celulares para que la célula afectada sintetice la sustancia deseada [75].

La reparación de las lesiones del CA puede conseguirse utilizando moléculas reguladoras de las células que aumenten sus actividades reparativas, que disminuyan sus actividades de degradación o

ambas posibilidades a la vez. Algunas de estas moléculas son el IGF-1; el FGF-2; las BMPs 2, 4 y 7; y el antagonista para el receptor de la IL-1. Se trata pues de transferir los genes que codifican estas moléculas al CA [76]. Así por ejemplo, la administración combinada de un factor anabólico como el IGF-1 con un inhibidor de la acción inflamatoria de las citocinas (por ejemplo la IL-1Ra) puede conseguir controlar la degradación de la MEC a la vez que restaura parcialmente la lesión de ésta [77]. Para la transferencia del material genético al interior de los condrocitos pueden utilizarse vectores virales o vectores no virales. Los vectores virales como los retrovirus, los adenovirus, los virus adeno-asociados y los herpes virus, se caracterizan por una mayor eficiencia en la TG [78]. Los sistemas de TG no virales, como los liposomas, el DNA puro o los ligandos de DNA, son en general más sencillos de sintetizar y tienen una toxicidad e inmunogenicidad menores. Sin embargo, su eficacia es menor por la baja tasa de infección celular que con su utilización se consigue [74]. La TG en el cartílago y en el hueso subcondral es posible mediante un procedimiento tanto ex vivo como in vivo. Los vectores pueden infectarse directamente en el tejido (in vivo) o pueden extraerse las células cartilaginosas lesionadas, manipularlas genéticamente in vitro y reimplantarlas en el lugar de la lesión (ex vivo). Mientras que el método directo es técnicamente menos exigente, la TG indirecta es más segura, ya que la manipulación genética se realiza en condiciones controladas fuera del organismo. Diversos estudios in vitro demuestran que mediante este método, los condrocitos son capaces de aumentar la biosíntesis de la MEC y de mantener el fenotipo condrocítico, especialmente la síntesis de COL II [79, 80]. En los estudios in vivo se depositan los genes en el interior de la articulación mediante diferentes tipos de células o de vectores y de manera directa (inyección intraarticular) o indirecta (mediante matrices o soportes). Tomita y col (1997) inyectan genes del antígeno SVT (SV 40 large T antigen) en rodillas de ratas y demuestran mediante inmunohistoquímica la expresión de éstos en los condrocitos, sin cambios patológicos en el cartílago [81]. Mason y col (2000) utiliza vectores retrovirales para introducir genes de la BMP-7 mediante soportes tridimensionales en rodillas de conejos, obteniendo regeneración completa del CA [82]. Sin embargo, la terapia génica no está exenta de riesgos. Mientras que es mayor el beneficio de su utilización en el tratamiento de las distrofias musculares malignas (entre otras enfermedades) respecto a los riesgos que el mismo entraña, algunos autores consideran que en el caso del tratamiento de las lesiones del CA no son aceptables estos riesgos (mutagénesis, malignización, toxicidad o alteración de la regulación del crecimiento celular) relacionados con la sobreexpresión de los factores de crecimiento celulares [83]. A pesar de los avances obtenidos en la reparación de las lesiones del CA mediante las técnicas de transferencia de genes, los estudios actuales sobre la materia pretenden lograr sintetizar CA cuya estructura sea igual a la del cartílago

hialino y que éste tenga una vida media alta. Para ello, se requieren sistemas de vectores más sofisticados que controlen la expresión de los genes incorporados a las células condrales [84]. En este sentido, se han descrito diferentes elementos específicos reguladores del CA como por ejemplo, los inductores de la proteína derivada del cartílago sensible al ácido retinoico (CD-RAP) [85], del procolágeno tipo II  $\alpha 1$  (COL2A1) [86] o del gen de los agreganos [87]. Asimismo, la utilización de CMMs constituye una alternativa para el tratamiento de las lesiones del CA. Se trata de células pluripotenciales con capacidad para reparar tejidos mesenquimales como el hueso, los ligamentos, la grasa, el músculo y el cartílago [88]. Estas células pueden obtenerse de diferentes tejidos: de la MO, del hueso trabecular, del tejido adiposo (TA) o del periostio [89]. Para aprovechar el potencial de las células madre en la IT del CA, se ha analizado el entorno ideal para estimular la condrogénesis. Para ello, se han utilizado factores de crecimiento como el TGF- $\beta 1$ , el TGF- $\beta 2$ , el TGF- $\beta 3$  y la BMP-2 [84]. De éste análisis surge la aplicación de las CMMs para el tratamiento de defectos condrales de espesor completo en humanos. Por ejemplo, Kuroda y col (2007) utilizan soportes de colágeno en los que aplican células madre procedentes de la MO autóloga de la cresta iliaca. Aplicados en el lecho de la lesión condral de espesor completo, obtiene histológicamente FC [90]. Otros autores como Wakitani y col (2007), consiguen los mismos resultados con este método en lesiones cartilaginosas del CA de la rótula [91]. El hecho de que en los primeros casos en los que se utiliza esta técnica el tejido resultante sea FC, hace que sea necesario recurrir a otros factores que junto con las CMMs, logren obtener CA estable sin osificación, fibrinogénesis o inflamación [92]. Con esta idea y para intentar conseguir un tejido cartilaginoso reparativo de características, estabilidad y durabilidad suficientes, diferentes estudios utilizan la TG aplicada a las CMMs [93], como los estudios desarrollados por Palmer y col. (2005) y Steinert y col. (2007), en los cuales se utilizaron CMM modificadas genéticamente mediante vectores adenovirales que codificaban para los factores IGF-1, TGF-B1 y BMP2, para evaluar el grado de diferenciación condrogénica de las CMM, encontrando que la expresión combinada de IGF-1 con TGF-B1 induce la diferenciación condrogénica de las CMM más que con la expresión de los factores solos o en otra combinación [93, 94]. En cualquier caso, en la actualidad, tanto en los estudios in vitro como in vivo, no se ha logrado obtener CA de reparación de características tanto histológicas como biomecánicas comparables al cartílago hialino de la articulación. Los diferentes obstáculos existentes para lograr dicho objetivo son principalmente la degradación de MEC, la integración o la diferenciación insuficientes de los condrocitos, la inestabilidad de las células o tejidos transferidos y la relativa eficacia de la TG de los diferentes factores condrogénicos, anti-inflamatorios y anti-oxidativos. Como la mayoría de estos factores tienen una vida media corta, autores como Steinert plantean la



posibilidad de administrar de manera repetida estas sustancias en la articulación o de lograr vectores de TG más sofisticados, que aseguren la reparación integral de las lesiones cartilaginosas articulares [84, 88].

## **2. Justificación**

Las opciones terapéuticas para las lesiones de cartílago son limitadas por su poca capacidad de regeneración post-traumática. Esto permite la oportunidad de estudiar una alternativa terapéutica nueva, consistente en la creación de un implante de CMMs autólogas modificadas genéticamente, con capacidad para proliferar y diferenciarse en condrocitos. La obtención de este implante sería muy útil para futuros ensayos clínicos en lesiones de cartílago.

## **3. Objetivos**

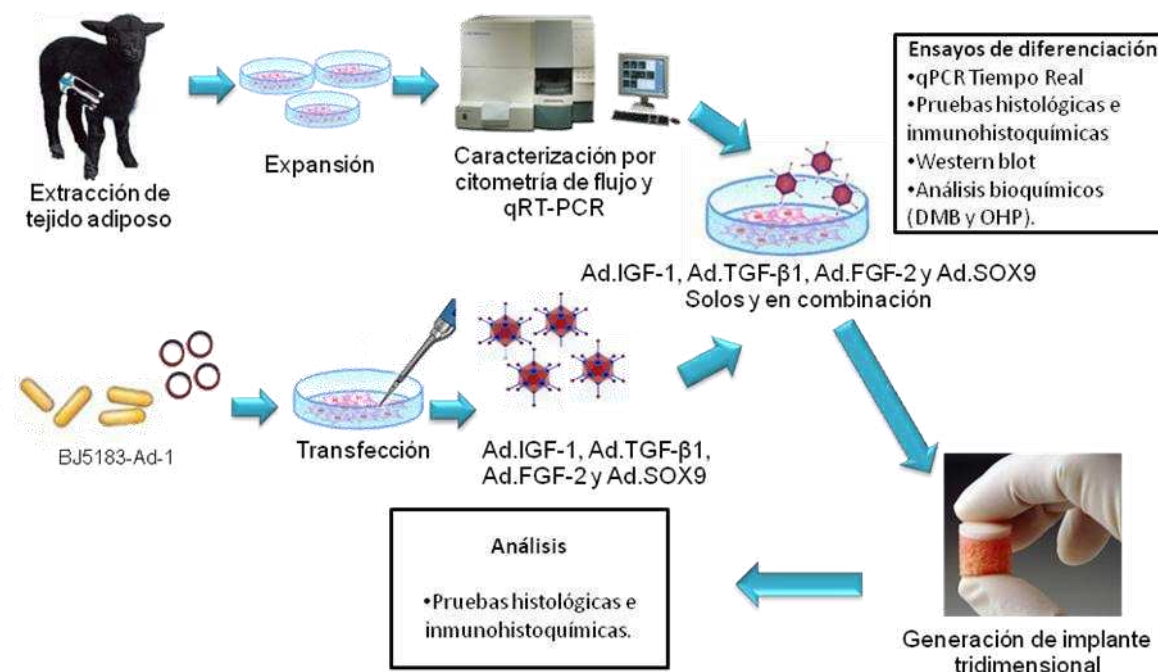
### **3.1. Objetivo General:**

Probar la utilidad de un implante construido con CMMs genéticamente modificadas con la combinación de factores de crecimiento más efectiva para su diferenciación a condrocitos. Además, las CMMs modificadas serán incluidas en una matriz de biomateriales que le brinde al implante soporte y protección para su desarrollo e integración condrogénica.

### **3.2. Objetivos Específicos**

1. Aislar y caracterizar CMMs de Ovis aries.
2. Generar una serie de vectores adenovirales recombinantes que expresen los genes IGF-1, TGF- $\beta$ 1, FGF-2 y SOX9.
3. Evaluar las combinaciones de los factores de transcripción y crecimiento IGF-1, TGF- $\beta$ 1, FGF-2 y SOX9 en CMMs que resulten en una mejor diferenciación condrogénica.
4. Generar un implante in vitro con potencial condrogénico que pueda ser empleado para futuros ensayos in vivo en Ovis aries para tratamiento de lesiones de cartílago.

#### 4. Estrategia general



**Figura 8. Estrategia general.** Se construyeron vectores adenovirales que portaban el cDNA codificante para IGF-1, TGF-β1, FGF-2 y SOX9 de homo sapiens. Se aislaron CMMs de TA proveniente de un *Ovis aries* joven, se expandieron in vitro y se caracterizaron mediante citometría de flujo y PCR en tiempo real (qRT-PCR) tamizando los antígenos de superficie: CD14 (-), CD34 (-), CD45 (-), CD73 (+), CD90 (+), CD105 (+), CD117 (-), CD166 (+), CD271 (+), MSCA (+) y GAPDH (+). Cultivos confluentes al 80% de CMMs en monocapa se infectaron con 100 MOIs de cada adenovirus recombinante individual (Ad.IGF-1, Ad.TGF-β1, Ad.FGF-2 y Ad.SOX9), o en combinación (Ad.IGF-1/Ad.TGF-β1, Ad.IGF-1/Ad.FGF-2, Ad.IGF-1/Ad.TGF-β1/Ad.SOX9 y Ad.IGF-1/Ad.FGF-2/Ad.SOX9) y una vez formado el agregado se cultivaron durante 3, 7, 14, 21 y 28 días. Se extrajo el RNA total de cada cultivo en cada tiempo y se retrotranscribió a cDNA. Se utilizó qRT-PCR para evaluar la expresión de los genes específicos de cartílago (COL I, COL II, COL X, proteoglicano, agrecano, biglicano, y proteína matriz de cartílago) en cada tiempo, mediante la técnica de Sybr green. La determinación de PGC y del colágeno presente en la matriz de cada agregado se realizó mediante ensayos bioquímicos (DMB y OHP), tinciones histológicas como azul de toluidina, safranina-O y fast green, e inmunohistoquímica y western blot para COL I, II y X, todo al día 28. Una vez seleccionada la mejor combinación de los factores de transcripción y crecimiento que diferenciaron de manera más efectiva a las CMMs a condrocitos, se cultivaron CMMs con la combinación seleccionada y sus respectivos controles en una matriz de alginato, generándose de esta manera el implante, el cual al día 28 de cultivo se evaluó su efectividad mediante pruebas inmunohistoquímicas determinando COL I, II y X.

## 5. Material y métodos

**5.1. Preparación de vectores adenovirales recombinantes:** Se construyeron vectores adenovirales de primera generación, serotipo 5 con E1 y E3-deletado, portadores de cDNAs para: proteína verde fluorescente (GFP), IGF-1 humano, TGF- $\beta$ 1 humano, FGF-2 humano y SOX9 humano, utilizando el método de Luo J, et al. [95]. Los vectores resultantes fueron designados como Ad.GFP, Ad.IGF-1, Ad.TGF- $\beta$ 1, Ad.FGF-2, y Ad.SOX9, respectivamente. Para generar preparaciones con títulos altos, los vectores recombinantes fueron amplificados en células HEK-293 y purificados mediante tres gradientes sucesivos de cloruro de cesio. Posteriormente fueron dializados con Tris-ácido hidrocloreídrico 10 mM, pH 7.4, cloruro de sodio 150 mM, cloruro de magnesio 10 mM, y sucrosa 4%, las preparaciones fueron alicuotadas y almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Los títulos virales fueron determinados mediante densidad óptica (O.D. 260 nm) y el método de TCID<sub>50</sub> (Tissue Culture Infectious Dose 50).

**5.2. Aislamiento, cultivo y caracterización de CMMs.** El protocolo de investigación que involucra la utilización de animales fue aprobado por el comité de ética de la Facultad de Medicina y HU, UANL (con el número de referencia: BI12-002), los experimentos fueron realizados siguiendo la Norma Oficial Mexicana 062-ZOO-1999, bajo condiciones de esterilidad. Las CMMs se aislaron de TA proveniente de un adulto joven de *Ovis aries*, 0.5 g de una biopsia de TA fueron digeridos con 800  $\mu\text{L}$  de colagenasa I (180 U/mL) en solución, siguiendo el protocolo de Dubois S, et al. [96]. Las células recolectadas fueron empastilladas mediante centrifugación a 1500 rpm por 10 min, y resuspendidas en Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) con 10% de suero bovino fetal (SBF) y 1% de Penicillin/Streptomycin/Amphotericin B (todo Invitrogen, Carlsbad, CA), posteriormente fueron sembradas en una caja de 75  $\text{cm}^2$  (Falcon, Beckton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ). Las células no adherentes fueron removidas al tercer día de cultivo; las células adherentes fueron lavadas con PBS y cultivadas en DMEM con 10% de SBF a  $37^{\circ}\text{C}$ , 5% de  $\text{CO}_2$  con cambio de medio cada tercer día. Después de 10 a 15 días, las colonias formadas de células adherentes fueron tripsinizadas y sembradas en varias cajas de 75  $\text{cm}^2$ , en placas de 6 pozos o de 96 pozos dependiendo del ensayo a realizar. Para confirmar el fenotipo de CMM, las células cultivadas fueron caracterizadas a través de inmunofenotipo y PCR transcriptasa reversa (RT-PCR). El inmunofenotipo fue realizado con un citómetro FACScan laser de argón (Becton Dickson, San Jose, CA), con los anticuerpos monoclonales anti-CD271-PE, anti-CD45-FITC y MSCA-APC (Todo AbD Serotec, Kidlington, UK). El RNA se extrajo del cultivo primario de las CMMs de acuerdo con el protocolo del reactivo TRIzol® (Invitrogen). El cDNA fué sintetizado a

partir del RNA total usando SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix y hexámeros (Invitrogen). Cien nanogramos del cDNA sintetizado se utilizaron como templado para la amplificación por PCR en 25 uL de volumen de reacción utilizando Taq DNA polimerasa (Promega, Madison, WI) y 500 nM de primers gen-específicos. Las amplificaciones fueron realizadas for 35 ciclos y los productos de la RT-PCR fueron visualizados en un gel de agarosa al 2% conteniendo 0.1 ug/mL de bromuro de etidio. Le secuencia de los primers y los tamaños de los productos para CD34, CD73, CD90, CD105, CD166, CD45, CD117, CD271, CD14, y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) están listados en la Tabla 1.

**5.3. Ensayo de viabilidad celular.** Las CMMs fueron sembradas en placas de 96 pozos y crecidas hasta 80% de confluencia, generando aproximadamente  $2.6 \times 10^4$  células por pozo. Cada pozo de células, por triplicado, fueron infectadas con dosis decrecientes de los vectores individuales Ad.GFP, Ad.IGF-1, Ad.TGF- $\beta$ 1, Ad.FGF-2, y Ad.SOX9 o en combinación (Ad.IGF-1/Ad.TGF- $\beta$ 1, Ad.IGF-1/Ad.FGF-2, Ad.IGF-1/Ad.TGF- $\beta$ 1/Ad.SOX9, y Ad.IGF-1/Ad.FGF-2/Ad.SOX9) en 100 uL de DMEM libre de suero. Dos horas posterior a la infección, los fluidos del cultivo fueron aspirados y reemplazados con 200 uL de DMEM conteniendo 2% de SBF y 1% de ampicilina/estreptomicina/anfotericina B. En paralelo, los cultivos de controles no transducidos fueron mantenidos en el mismo medio. Las CMMs transducidas fueron incubadas a 37°C, 95% de humedad y 5% de CO<sub>2</sub> durante 10 días, al término de los cuales se les midió la viabilidad de acuerdo con el protocolo del AlamarBlue® (Invitrogen).

**5.4. Transducción adenoviral de las CMMs en monocapa.** Siguiendo el sembrado inicial, los cultivos adherentes de CMMs fueron sembrados en placas de 6 pozos y crecidas a 80% de confluencia, generando aproximadamente  $7.6 \times 10^5$  células por pozo. Cada pozo de células, por triplicado, fueron infectados con 100 MOIs de Ad.IGF-1, Ad.TGF- $\beta$ 1, Ad.FGF-2 y Ad.SOX9 solos o en combinación (Ad.IGF-1/Ad.TGF- $\beta$ 1, Ad.IGF-1/Ad.FGF-2, Ad.IGF-1/Ad.TGF- $\beta$ 1/Ad.SOX9 and Ad.IGF-1/Ad.FGF-2/Ad.Sox9) en 800 uL de DMEM libre de suero. Similarmente, cultivos de controles negativos fueron infectados con Ad.GFP. Dos horas después de la infección, los fluidos del cultivo fueron aspirados y reemplazados con 2mL de DMEM el cual contenía glucosa 25 mM, insulina-transferrina-sodio selenito 6.25 µg/mL, ácido linoléico 5.33 µg/mL, albúmina bovina sérica 1.25 mg/mL, dexametazona 100 nM, L-ascorbico-2-fosfato 50 µg/mL, piruvato de sodio 2 mM, L-prolina 40 µg/mL, SBF 10% y ampicilina/estreptomicina/anfotericina B 1%. Paralelamente, cultivos no-transducidos (control positivo), fueron reemplazados con 2 mL de HyClone

AdvanceSTEM Chondrogenic Differentiation Medium (Thermo Scientific, Rockford, IL). Las células fueron cultivadas a 37°C, 95% de humedad y 5% de CO<sub>2</sub>, y comenzaron a formar agregados esféricos después del día 3 de cultivo, excepto el control negativo el cual se mantuvo en monocapa. El medio se recambió cada tercer día. Los cultivos se levantaron a diferentes tiempos (0, 3, 14, y 28 días) para el análisis de qRT-PCR y a los días 14 y 28 para análisis histológicos y bioquímicos. Los cultivos transducidos con Ad.GFP fueron visualizados por fluorescencia a las 48 horas posteriores a la infección.

**5.5. Ensayo de qRT-PCR.** Se utilizó qRT-PCR para detectar cuantitativamente la transcripción de genes cartílago específicos posterior a la infección de CMMs con 100 MOIs de Ad.IGF-1, Ad.TGF- $\beta$ 1, Ad.FGF-2 y Ad.SOX9 solos o en combinación (Ad.IGF-1/Ad.TGF- $\beta$ 1, Ad.IGF-1/Ad.FGF-2, Ad.IGF-1/Ad.TGF- $\beta$ 1/Ad.SOX9 y Ad.IGF-1/Ad.FGF-2/Ad.Sox9). Se extrajo el RNA total de cada triplicado, de cada grupo de CMMs a evaluar cultivadas en monocapa o en agregado por cada diferente tiempo (0, 3, 14, y 28 días), utilizando TRIzol® Reagent (Invitrogen). El cDNA se sintetizó a partir del RNA total utilizando SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix y random hexameros (Invitrogen). La qRT-PCR se realizó utilizando un equipo CFX96 real-time PCR detection system (Bio-Rad, Hercules, CA) en placas de 96 pozos. Veinte nanogramos del cDNA sintetizado se utilizó como template para la amplificación en un volumen final de 15  $\mu$ L utilizando 1X iQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad), y 500 nM de primers gen-específico, los cuales fueron diseñados basados en la secuencia GenBank respectiva para el gen examinado. Las amplificaciones se realizaron con el siguiente programa de termociclado: pre-desnaturalización a 95°C por 10min, amplificación de la PCR mediante 40 ciclos constituidos por desnaturalización a 95°C por 15s, y alineamiento a 60°C por 1min. La serie de ciclos fueron seguidas por un análisis de melt-curve para verificar la especificidad de la reacción. Las secuencias y el tamaño de los productos de los primers sentido y anti-sentido para agregano (AGC), biglicano (BGC), matriz de cartílago (CM), colágeno I (COL I), colágeno II (COL II), colágeno X (COL X), proteoglucano (PGC), IGF-1, TGF- $\beta$ 1, FGF-2, SOX9, y GAPDH están listados en la Tabla 1. La eficiencia y especificidad de cada juego de primers se evaluó mediante el método de curva estándar relativa y el perfil de la melting curve, la eficiencia de amplificación relativa al gen GAPDH fue evaluada mediante el método de curva estándar relativa, todo lo anterior de acuerdo con el proceso de estandarización antes reportado [97].

**5.6. Análisis bioquímico.** Tres agregados por grupo, cultivados durante 28 días, fueron digeridos mediante incubación a 65°C por 18 horas en 1mL de solución de papaína la cual contenía papaína

125 ug/mL, L-cisteína-HCl 5 mM, y EDTA 5 mM, en fosfato de sodio monobásico (pH 6.2) 100 mM. El contenido total de glucosaminoglicanos sulfatados (GAGs) se determinó utilizando condroitín sulfato de tiburón como estándar y midiendo el contenido de GAGs en las muestras con 1,9-dimetilmetileno azul (DMB). El contenido total de colágeno se determinó mediante la medición del contenido de hidroxiprolina (OHP) después de la hidrólisis ácida de los agregados digeridos y su posterior reacción con p-dimetilaminobenzaldehído y cloramina-T, utilizando 0.134 como factor de conversión (radio) de hidroxiprolina a colágeno (todo Sigma-Aldrich). Ambos, el contenido total de colágeno y GAGs, fueron normalizados con el contenido total de DNA, el cual fue medido fluorométricamente utilizando la tinción Hoechst 33258 (bisbencimida) DNA quantitation kit de acuerdo con el protocolo del fabricante (longitud de onda de excitación: 485 nm; longitud de onda de emisión: 535 nm). La concentración de DNA se determinó utilizando una curva estándar de DNA de timo de ternero (todo Bio-Rad).

**5.7. Análisis histológico e inmunohistoquímico.** Antes del procesamiento del tejido, se fotografiaron agregados representativos de cada grupo utilizando una cámara digital (Modelo C653; Kodak, Rochester, NY, USA). Para el análisis histológico, los triplicados de agregados por grupo, cultivados por 14 y 28 días, fueron embebidos en Tissue-Tek® O.C.T™ Compound (Sakura Finetek, Torrance, CA, USA) para su fácil manejo, congelados a -20°C y seccionados con 10 µm de grosor utilizando un criostato Tissue-Tek cryostat (Modelo 4553; Miles Inc. Elkhart, IN, USA). Secciones representativas fueron teñidas con azul de toluidina para la detección de PGC, y con safranina-O/ fast green para la detección de acumulos de proteoglucanos sulfatados (todo Sigma-Aldrich). Para las inmunohistoquímicas, secciones representativas de los triplicados de agregados por grupo, cultivados por 28 días, preparados como se describe arriba, fueron lavados con PBS y tratados secuencialmente con 30% (vol/vol) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/metanol a un radio de 1:9 por 10 min, y 0.15% TritonX-100 en PBS 1X por 10 min. Las secciones fueron bloqueadas con 5% de BSA en PBS por 30 min. Posteriormente las secciones fueron incubadas toda la noche a 4°C con anticuerpos primarios monoclonales de ratón anti-COL I y II (todo Abcam, UK) y el anticuerpo primario monoclonal de ratón anti-COL X (Sigma-Aldrich) diluido en 1% de BSA en PBS. Después de 3 lavados con PBS para remover los anticuerpos primarios no unidos, las secciones fueron incubadas con el anticuerpo secundario biotinilado anti-ratón IgG por 1 h y con solución de peroxidasa-conjugada con estreptavidina por 30 min a temperatura ambiente (ambos de Dakocytomation, CA). Las laminillas fueron lavadas y montadas en Fluoromount-G™ (SouthernBiotech, Birmingham,

AL), y cubiertas para observación microscópica (Model E600; Nikon Corporation, Japan). Cada experimento descrito se realizó por triplicado utilizando 3 agregados por grupo.

**5.8. Análisis de western blot y densitometría.** Aproximadamente  $3 \times 10^6$  CMMs por placa de  $75 \text{ cm}^2$  fueron: 1) transducidas con Ad.IGF-1/Ad.FGF-2 (50 MOIs de cada uno), 2) no-transducidas pero estimuladas con HyClone AdvanceSTEM Chondrogenic Differentiation Medium (Thermo Scientific) (control positivo), y 3) CMMs no-estimuladas y crecidas en DMEM (control negativo). A los cultivos anteriores se les extrajo proteínas totales al día 28 post-transducción, posteriormente se realizó la detección de COL I, II, y X mediante análisis de western blot. Brevemente,  $50 \mu\text{g}$  de proteína total extraída en buffer Laemmli fué sometida a SDS-PAGE 10% y transferida a una membrana de nitrocelulosa; el bloqueo fue realizado con leche sin grasa 5% en TBST. GAPDH fue detectado como control utilizando un anticuerpo primario policlonal de conejo anti-human GAPDH (dilución 1:5000) (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA) y un anticuerpo secundario de cabra anti-conejo IgG conjugado con peroxidasa de rábano (dilución 1:5000) (Santa Cruz Biotechnology Inc.). Los anticuerpos primarios policlonales de conejo anti-humano COL I, II y X (dilución 1:3000) (Abcam) fueron utilizados para detectar COL I, II, y X, respectivamente. Los anticuerpos unidos se detectaron con el anticuerpo secundario de cabra anti-conejo IgG conjugado con peroxidasa de rábano (1:5000) (Abcam). El análisis densitométrico, utilizando la expresión de GAPDH para la normalización del ensayo, fue realizado con el software Phoretix 1D (TotalLab Ltd).

**5.9. Cultivo de CMMs en soporte de alginato.** Se sembraron CMMs en el soporte AlgiMatrix™ 3D Culture System (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA), colocado en una placa de cultivo celular de 96-pozos, cada pozo de esta placa contenía un soporte por lo que se sembraron 9 pozos: 3 pozos fueron sembrados con CMMs cultivadas en medio de diferenciación condrogénica (control positivo), 3 pozos fueron sembrados con CMMs transducidas con la combinación AD.IGF-1/Ad.FGF-2 cultivadas en medio DMEM suplementado, y 3 pozos fueron sembrados con CMMs transducidas con Ad.GFP cultivadas en medio DMEM suplementado (control negativo), las CMMs se sembraron a una densidad de  $1 \times 10^6$  células/mL, utilizando el método de sembrado dinámico. Brevemente, CMMs en suspensión (0.2mL) fueron pipeteadas y colocadas sobre la superficie del soporte seco, la placa fue centrifugada de inmediato a  $100 \times g$  por 4 min para hacer el sembrado dinámico, se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  por 15 min. Posteriormente, las CMMs sembradas fueron infectadas con 100 MOIs de los vectores adenovirales correspondientes en medio DMEM con 2% de SBF sin



antibiótico, 2 horas después de la infección se recambio el medio por 400uL del medio correspondiente, cubriendo por completo el soporte sembrado. Se incubó la placa a 37°C, con 95% de humedad y 5% de CO<sub>2</sub>, diariamente se sustituía el medio. A los 28 días de cultivo los soportes fueron retirados de la placa, embebidos en OCT y preparados para las pruebas histoquímicas e inmunohistoquímicas antes descritas.

**5.10. Análisis estadístico.** Los datos de los ensayos de viabilidad celular, qRT-PCR y bioquímicos fueron analizados para determinar significancia estadística entre dos especímenes comparativos mediante una prueba T de Student o Mann-Whitney U de acuerdo con la distribución de normalidad de los datos, utilizando el software SigmaPlot v11.0 (Systat Software Inc, San Jose, CA). Los datos fueron presentados como promedio  $\pm$  desviación estándar (SD). Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando  $p < 0.05$ .

**Tabla 2**

Descripción de los primers utilizados en el estudio.

Gen	No. Ref.	Primers 5' → 3'	tm	Producto PCR (pb)
CD105	BC114687*	F: CTGATCCTCAGCGTGAACAA R: GACGAAGGAAGATGCTTTGC	60	226
CD117	D16680.1*	F: CTCAGCCATCTGTGAGTCCA R: CTCTGCTTTCTCGGTGATCC	60	191
CD14	NM_174008.1*	F: GCAGCCTGGAACAGTTTCTC R: TCCTCAAGCGTCAGTTCCTT	60	178
CD166	NM_174238.1*	F: CGCAATGCAACAGGAGACTA R: GGCTAGATCGAAGCTTGACG	60	217
CD271	BC142255.1*	F: CATCTCTGTGGACAGCCAGA R: TCAGGCTGGTAACCCAACTC	60	195
CD34	NM_174009.1*	F: GGTGGCTGATACCGAACTGT R: TCAGCATCTTGGCTGTATGC	60	280
CD45	BC148881.1*	F: CCACGGGTATTCAAGCAAGTT R: CCCAGATCATCCTCCAGAAA	60	244
CD73	NM_174129.3*	F: CTGAGACACCCGGATGAGAT R: ACTGGACCAGGTCAAAGGTG	60	160
CD90	NM_001034765.1*	F: CACCTCTGCCAATACCACCT R: ATACCCCTCCATCCTTCCAC	60	196
Agrecano	NM_173981.2*	F: CAGAGTTCAGTGGGACAGCA R: AGACACCCAGCTCTCCTGAA	60	189
Biglicano	BT021201.1*	F: ACCTCCCTGAGACCCTCAAT R: TTGTTGTCCAAGTGCAGCTC	60	184

P. Matriz de cartílago	X74326.1*	F: ATGCGGACAAGGTGGTAGAC R: TCTCCATACCCTGGTTGAGC	60	153
Col II	X02420.1*	F: AGAGACCTGAACTGGGCAGA R: CAGAATAGCGCCGTTGTGTA	60	211
Col I	FJ200442.1	F: GGTGACAGGAAGTCCCAGAA R: CCATCGTAGGTGACGCTGTA	60	167
Col X	X53556.1*	F: ACCGAGAACGACCAGGTATG R: AACTCAAGAGGGCCTTCACA	60	279
Proteoglicano	NM_174288.1*	F: TGCTGTGATTGCCTCTTTTG R: CCAAAACCCGTAGTTCCTGA	60	169
FGF-2	NM_002006†	F: AGAAGAGCGACCCTCACATCA R: ACTGCCCAGTTCGTTTCAGTG	60	237
IGF-1	NM_000618†	F: CAACAAGCCACAGGGTATGG R: GCACTCCCTCTACTTGCGTTC	60	219
TGF-β1	NM_000660†	F: GGCCAGATCCTGTCCAAGC R: GTGGGTTTCCACCATTAGCAC	60	201
SOX9	NM_000346†	F: AGACAGCCCCCTATCGACTTC R: TGCTGCTTGGACATCCACAC	60	230
GAPDH	AF022183.1	F: GATTGTCAGCAATGCCTCCT R: AAGCAGGGATGATGTTTTGG	60	194

\*Secuencia diseñada sobre el genoma de *Bos Taurus* debido a que el genoma de *Ovis aries* no está ensamblado para este gen.

†Secuencia diseñada sobre el genoma humano.

Descripción de los primers utilizados en el análisis de qRT-PCR con el kit iScript™ One Step RT-PCR Kit with SYBR® Green, BIO-RAD. F: forward (primer sentido); R: reverse (primer anti-sentido).

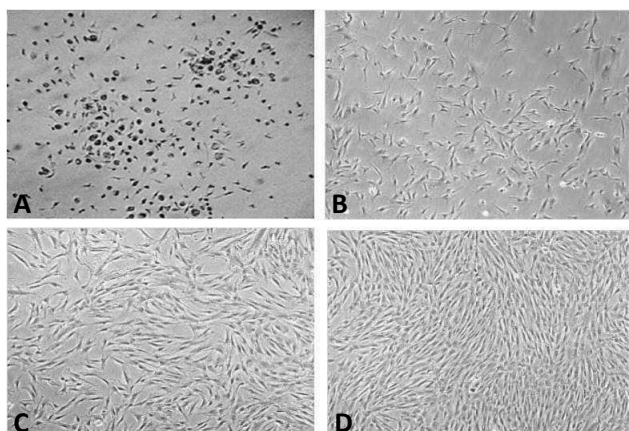
## 6. Resultados

### 6.1. Aislamiento, cultivo y expansión de las CMMs

Se aislaron CMMs tanto de TA como de MO proveniente de un adulto joven de *Ovis aries* de la raza peli buey (Fig. 14). Después de 10 días de cultivo se podían observar colonias de células adherentes con morfología fibroblastoide (alargadas en forma de huso), observándose al día 15 de cultivo una confluencia del 80% en las CMMs provenientes del TA. Esta confluencia es la indicada para realizar los ensayos ya que arriba de este porcentaje se corre el riesgo de que las CMMs se diferencien (Fig. 15). A pesar de que se aislaron CMMs tanto de TA como de MO, se decidió utilizar las CMMs de TA ya que se obtuvieron en mayor cantidad, es decir, se recuperaban más CMMs de 1 cm<sup>3</sup> de TA que de 1 cm<sup>3</sup> de MO, además de que su tasa de duplicación era mayor que las de MO, alcanzando las primeras la confluencia necesaria en menor tiempo.



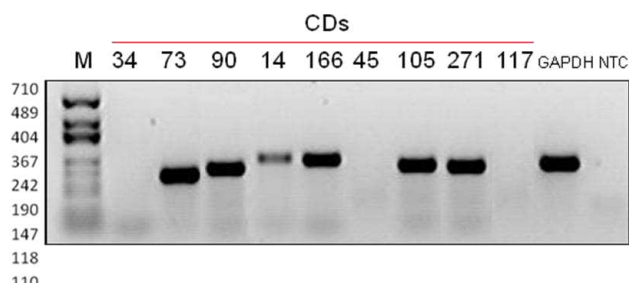
**Figura 9.** Aislamiento de CMMs de *Ovis aries*. Se aislaron CMMs tanto de TA (C y D) como de MO (E y F) proveniente de un adulto joven de *Ovis aries* (A y B).



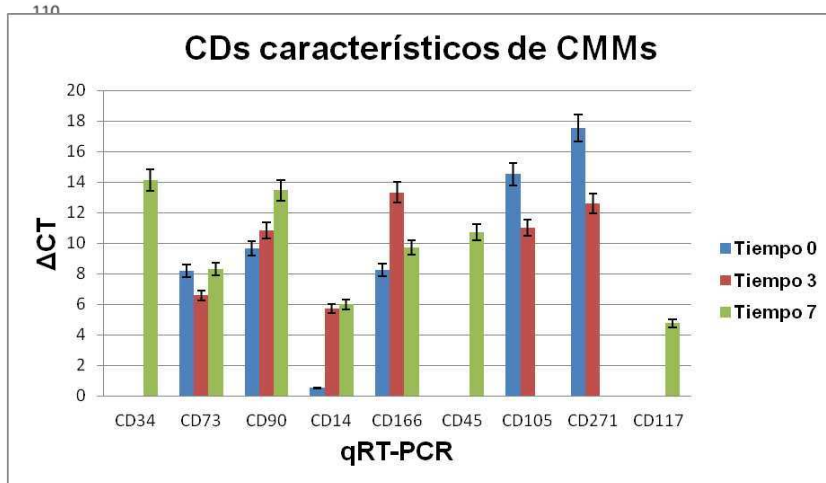
**Figura 10.** Cultivo de CMMs. A) Se observan células adherentes provenientes de TA al día 2 de cultivo. B) Células adherentes al 40% de confluencia al día 10 de cultivo. C) Células adherentes al 80% de confluencia al día 15 de cultivo. D) Células adherentes al 98% de confluencia al día 17 de cultivo.

## 6.2. Caracterización fenotípica de CMMs

El primer pasaje de células fueron caracterizadas a través de la detección de marcadores específicos para células madre mediante inmunofenotipo por citometría de flujo, RT-PCR y qRT-PCR. El inmunofenotipo mostró que la expresión de CD271, MSCA y CD45 fue de 85.82%, 95.55% y 36.78%, respectivamente (Fig. 16). La RT-PCR mostró amplificación para CD73, CD90, CD14, CD166, CD105, CD271, y GAPDH, y no amplificación para CD34, CD45, y CD117. Este perfil de expresión es típico para CMM con excepción de CD45 y CD14 (Fig. 17). La caracterización fenotípica esta resumida en la tabla 2 [98, 99]. Así mismo se analizó la expresión de los antígenos de superficie CD14, CD34, CD45, CD73, CD90, CD105, CD117, CD166 y CD271 en las CMMs a través del tiempo (0, 3 y 7 días) mediante qRT-PCR para ver en que momento del cultivo la expresión de estos CDs cambiaba, siendo esto un indicador directo de diferenciación de las CMMs. El análisis mostró que al tiempo 0 estaban expresados los genes CD73, CD90, CD105, CD166, CD271 y CD14 y que no se expresaban los genes CD34, CD45, y CD117, siendo éste perfil de expresión típico para CMM, con excepción de CD14. El mismo perfil se mantuvo al día 3, pero al día 7 los genes CD34, CD45, CD105, CD271 y CD117 cambiaron su expresión, indicando que ya para el día 7 de cultivo en monocapa, las CMMs en confluencia se comienzan a diferenciar. Los niveles de expresión de los genes anteriores fueron normalizados con GAPDH (Fig. 18). En general estos resultados demostraron un aislamiento exitoso de CMMs.

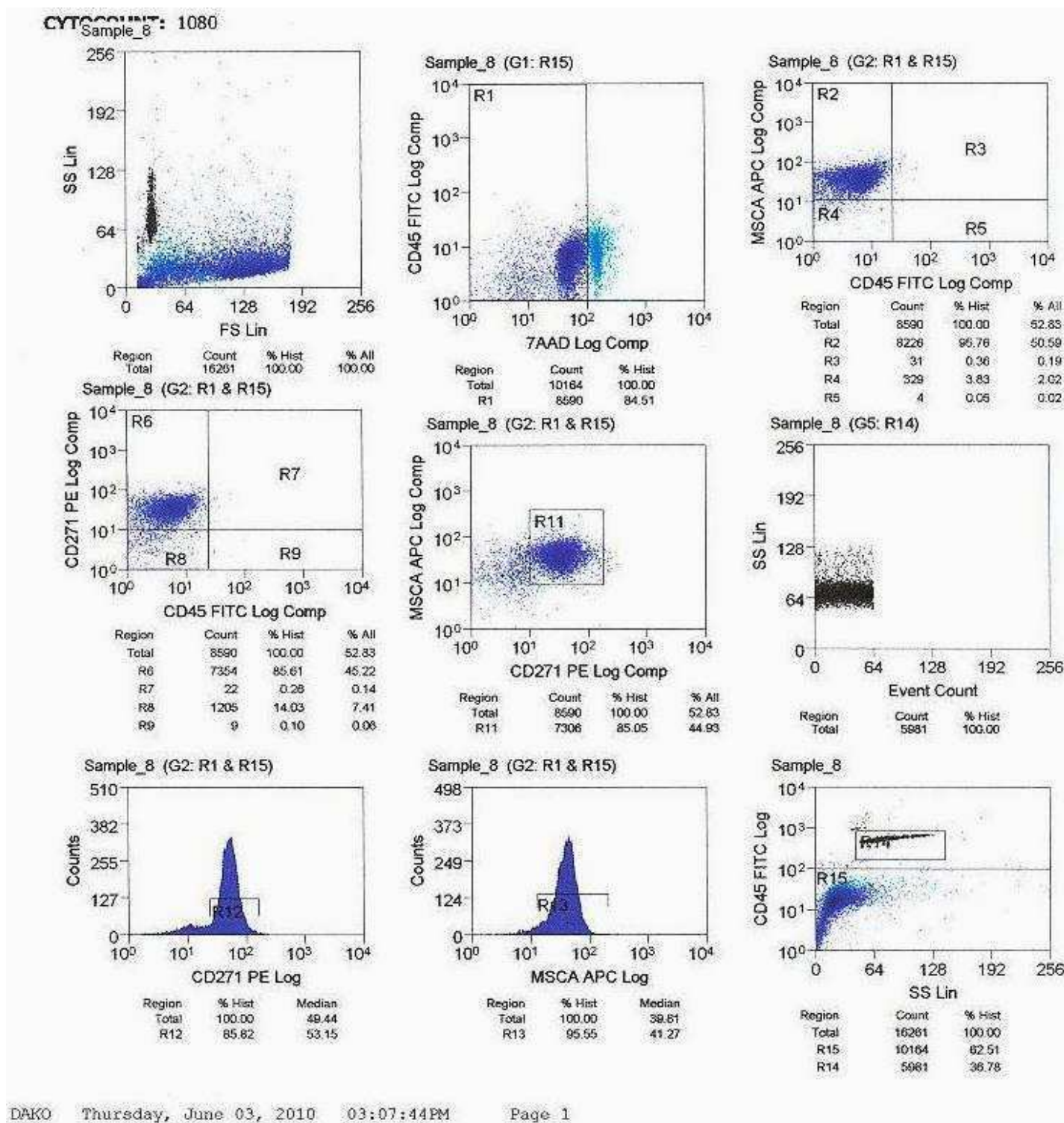


**Figura 11.** RT-PCR. Se amplificaron los genes CD14, CD34, CD45, CD73, CD90, CD105, CD117, CD166 y CD271 para detectar su expresión en la caracterización de CMMs.



**Figura 12.** qRT-PCR. Se amplificaron los genes CD14, CD34, CD45, CD73, CD90, CD105, CD117, CD166 y CD271 para detectar su nivel de expresión a través del tiempo (0, 3 y 7 días) en la caracterización de CMMs y así estimar el tiempo que se pueden tener en cultivo en confluencia sin diferenciarse.





**Figura 13.** Inmunofenotipo por citometría de flujo. Se detectó la expresión de los antígenos de superficie CD271, MSCA y CD45 para la caracterización de CMMs.

**Tabla 3**

Caracterización fenotípica de CMMs mediante inmunofenotipo y RT-PCR.

Marcador analizado	Inmunofenotipo*	RT-PCR§
Positivo‡	CD73	NE
	CD90	NE
	CD105	NE
	CD166	NE
	CD271	++
	MSCA	++
Negativo‡	CD14	NE
	CD34	NE
	CD45	+
	CD117	NE
GAPDH†		NE
		++

‡Resultado esperado de la expresión de antígenos de superficie en CMMs de acuerdo con la literatura [98, 99].

\*Símbolos: NE no evaluado, + positivo ( $\leq 50\%$ ), ++ positivo ( $\geq 85\%$ ).

§Símbolos: NE no evaluado, - negativo, + positivo (banda débil), ++ positivo (banda intensa).

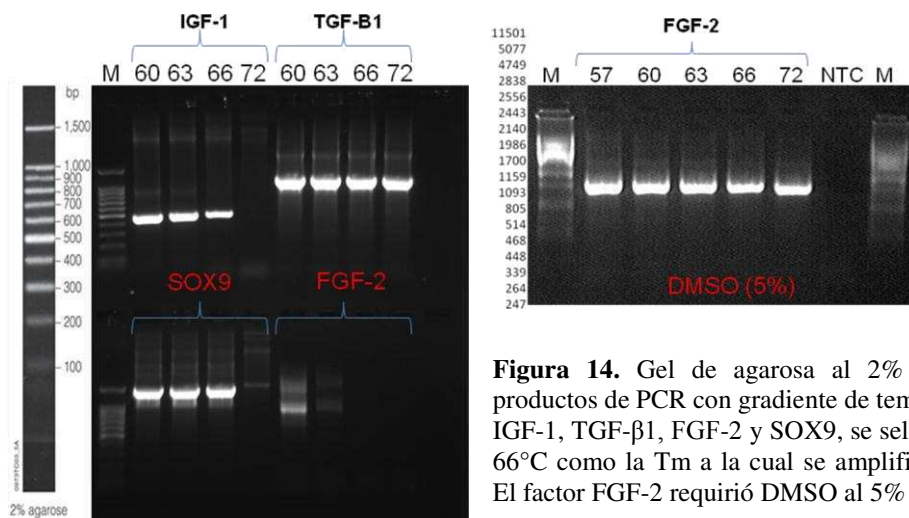
†Gen endógeno.

### 6.3. Construcción de los vectores adenovirales

Se construyeron vectores adenovirales mediante la amplificación de los factores de interés a partir de clonas comerciales (plásmidos portadores de IGF-1, TGF- $\beta$ 1, FGF-2 y SOX9) con los primers descritos en la tabla 3, los cuales contenían sitios de restricción para Bgl II y Xba I, lo que nos permitiría digerir los productos y ligarlos al vector pShuttle. En la figura 19 se muestra el gel de agarosa al 2% con los productos de amplificación de la PCR con gradiente de temperatura para los factores IGF-1, TGF- $\beta$ 1, FGF-2 y SOX9, en el cual se puede observar que los primers diseñados si amplificaron los productos del tamaño esperado y que el factor de FGF-2 por ser su secuencia rica en GCs requirió que se le agregara a la reacción DMSO 5% para lograr su amplificación, se seleccionó la temperatura de 66°C como la Tm a la cual se realizaría la amplificación de todos los factores por mostrar bandas más definidas y únicas.

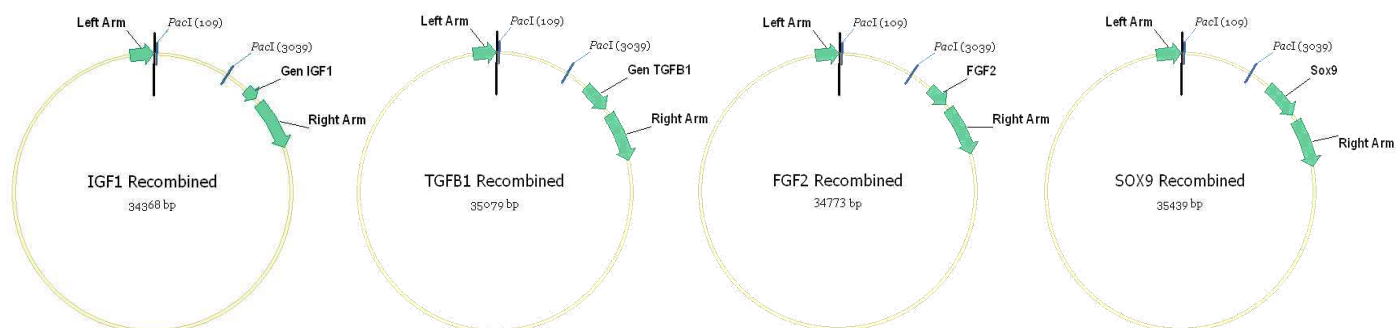
**Tabla 4.** Descripción de los primers utilizados en la construcción de los vectores adenovirales.

Gen	Amplión (pb)	Iniciador Fw. (con sitio Bgl II)	Iniciador Rv. (con sitio Xba I)
IGF-1	478	TAGAGATCTATGGGAAAAATCAGCAGTCTTC	ATCTAGACTACATCCTGTAGTCTTGTTC
TGF- $\beta$ 1	1189	TAGAGATCTATGCCGCCCTCCGGGTGCGGC	ATCTAGATCAGCTGCACTTGCAAGGAGCGC
SOX9	1546	TAGAGATCTATGAATCTCCTGGACCCCTTC	ATCTAGATCAAGGTCGAGTGAGCTGTGTG
FGF-2	883	TAGAGATCTCTGGTGGGTGTGGGGGTGGAG	ATCTAGATCAGCTCTTAGCAGACATTGGAAG



**Figura 14.** Gel de agarosa al 2% donde se observan los productos de PCR con gradiente de temperatura para los factores IGF-1, TGF- $\beta$ 1, FGF-2 y SOX9, se seleccionó la temperatura de 66°C como la T<sub>m</sub> a la cual se amplificarían todos los factores. El factor FGF-2 requirió DMSO al 5% para poder amplificar.

Posterior a la amplificación de los factores de interés, ahora con los sitios de restricción incluídos, se digirieron los productos con Bgl II y Xba I, y se ligaron al vector pShuttle, este vector construído, pShuttle-Gen linearizado con Pme I, junto con el pAdEasy fueron introducidos mediante co-transformación a la cepa bacteriana BJ5183 en la cual se recombinaron ambos plásmidos para formar el pAdEasy-Gen, los plásmidos recombinantes obtenidos (Fig. 19), alrededor de 30 colonias por factor de interés, se caracterizaron mediante PCR y restricción para seleccionar la clona que tuviera el plásmido correcto.

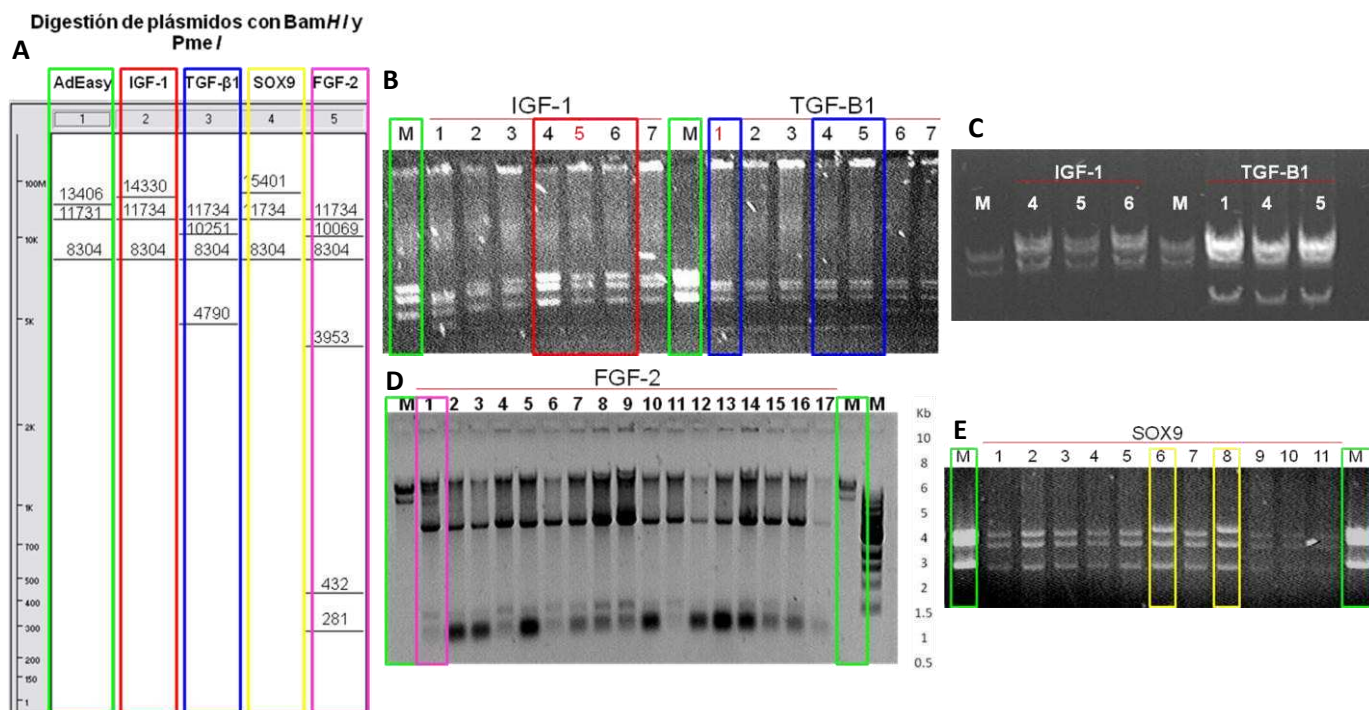


**Figura 15.** Diseño in silico de los vectores pAdEasy-Gen obtenidos mediante la recombinación del vector pShuttle y pAdEasy en bacterias BJ5183 para cada factor de interés: pAdEasy-IGF-1, pAdEasy-TGF- $\beta$ 1, pAdEasy-FGF-2 y pAdEasy-SOX9, con tamaños de 34,368pb, 35,079pb, 34,773pb, y 35,439pb respectivamente.

### 6.3.1. Caracterización de los vectores recombinantes pAdEasy-IGF-1, pAdEasy-TGF- $\beta$ 1, pAdEasy-FGF-2 y pAdEasy-SOX9.

Se caracterizaron los vectores recombinantes pAdEasy-Gen obtenidos, aproximadamente 30 clonas por factor de interés, mediante digestión con las enzimas de restricción BamH I y Pme I, y amplificación gen específico por PCR de las clonas candidatas seleccionadas. En la figura 20 (A) se

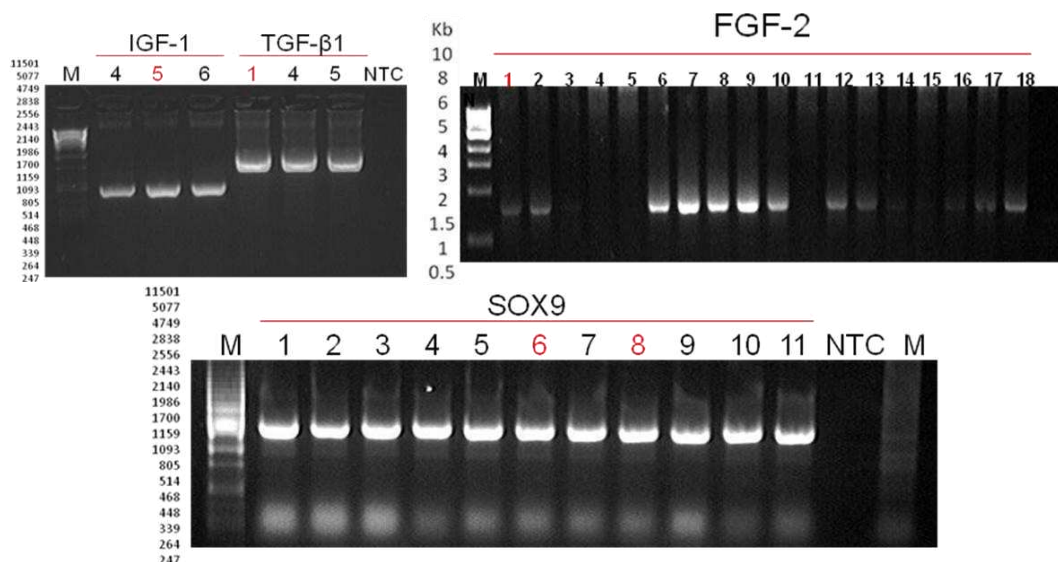
observa el patrón de restricción in silico para los vectores recombinantes pAdEasy-IGF-1, pAdEasy-TGF- $\beta$ 1, pAdEasy-FGF-2, pAdEasy-SOX9 así como el vector pAdEasy solo (utilizado como marcador de peso molecular). En el gel de agarosa 0.8% (B) se muestra la digestión para los candidatos de pAdEasy-IGF-1, en el cual los candidatos 4, 5 y 6 mostraron el patrón de digestión esperado en comparación con el marcador; así mismo se muestran los candidatos de pAdEasy-TGF- $\beta$ 1, en el cual los candidatos 1, 4 y 5 mostraron el patrón de digestión esperado en comparación con el marcador. A estos candidatos seleccionados tanto para pAdEasy-IGF-1 y pAdEasy-TGF- $\beta$ 1 (C) se les repitió la digestión para confirmar que efectivamente su patrón era el esperado. En el gel de agarosa 0.8% (D) se muestra la digestión para los candidatos de pAdEasy-FGF-2, en el cual solamente el candidato 1 mostró el patrón de digestión esperado en comparación con el marcador. Por último, en el gel de agarosa 0.8% (E) se muestra la digestión para los candidatos de pAdEasy-SOX9, en el cual los candidatos 6 y 8 mostraron el patrón de digestión esperado en comparación con el marcador.



**Figura 16.** Caracterización de los vectores recombinantes pAdEasy-Gen obtenidos mediante las enzimas de restricción BamHI y PmeI. (A) simulación in silico del patrón de restricción para cada uno de los vectores recombinantes y del marcador (AdEasy solo). (B y C) Patrón de restricción de para los candidatos de pAdEasy-IGF-1 y pAdEasy-TGF- $\beta$ 1. (D) Patrón de restricción para los candidatos de pAdEasy-FGF-2. (E) Patrón de restricción para los candidatos de pAdEasy-SOX9.

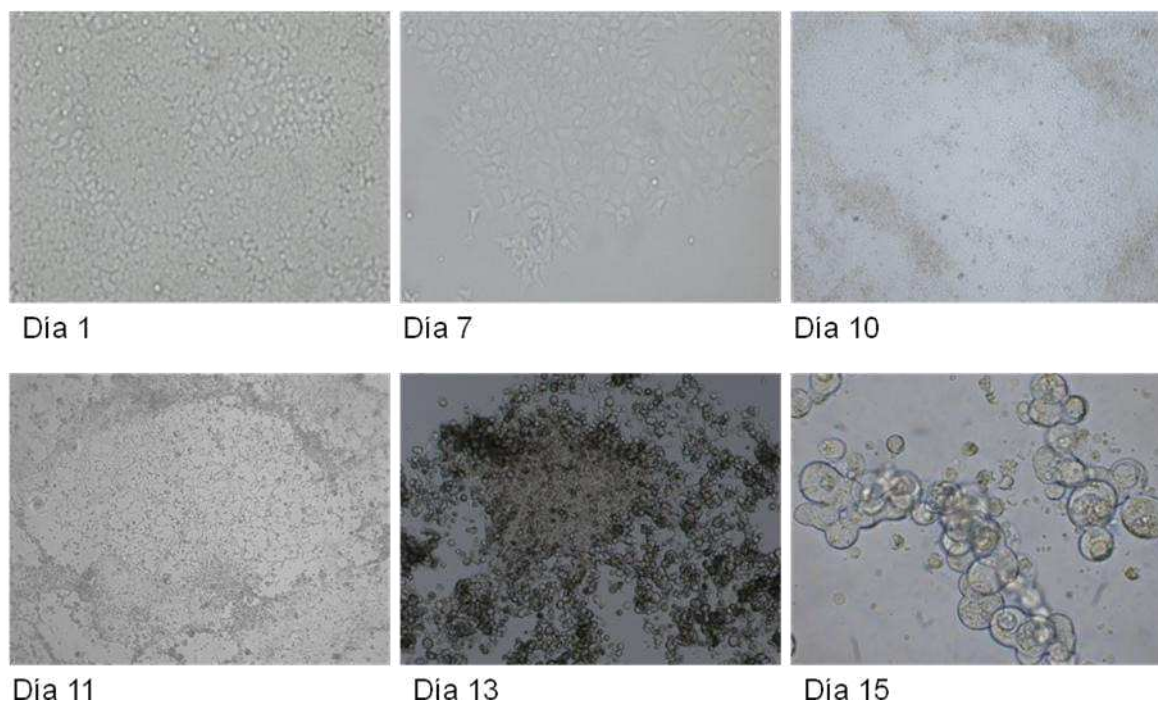


Una vez caracterizadas las clonas mediante digestión con las enzimas de restricción BamH I y Pme I, se realizó la amplificación gen específico por PCR de las clonas candidatas seleccionadas (Fig. 21), en todos los casos amplificaron los productos de los tamaños esperados: 478, 1189, 1546 y 883 pb para IGF-1, TGF- $\beta$ 1, SOX9 y FGF-2, respectivamente.



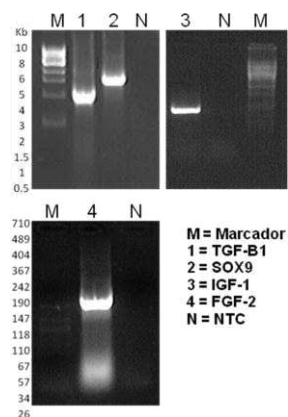
**Figura 17.** Geles de agarosa al 0.8%, donde se muestran los productos de amplificación gen específico por PCR para los vectores recombinantes, en los cuales los tamaños de los productos fueron los esperados (478, 1189, 1546 y 883 pb para IGF-1, TGF- $\beta$ 1, SOX9 y FGF-2, respectivamente).

Una vez que se caracterizaron y se seleccionaron los mejores candidatos para cada uno de los vectores recombinantes, éstos se propagaron en bacterias DH5 $\alpha$ , se purificaron, y se digirieron con Pac I; un vez linearizados se transfectaron a las células Hek-293 para producir las partículas virales. En la figura 22 se observan los cultivos de células Hek-293 transfectadas con los vectores recombinantes seleccionados, en donde al día 7 de cultivo ya se empieza a ver un cambio en la morfología celular, viéndose ahora las células hinchadas, al día 10 y 11 ya se pueden apreciar la formación de placas líticas y al día 15 las células completamente hinchadas y levantadas. Una vez obtenidas las partículas virales se infectaron 20 cajas de 150 cm<sup>2</sup> para lograr una producción a gran escala, levantando las células al día 10 de cultivo, ya que se deben de levantar en cuanto se observe la formación de placas líticas para lograr una mayor recuperación viral, mediante congelación y descongelación celular, los virus obtenidos se purificaron mediante un gradiente de densidad de CsCl, y se alicuotaron, quedando listos para su cuantificación.



**Figura 18.** Cultivos de células Hek-293 transfectadas con los vectores recombinantes seleccionados. Se observa el cambio de morfología celular a partir del día 7 y la formación de placas líticas a partir del día 10, al día 15 las células se encuentran completamente levantadas.

Una vez purificada la producción viral, se volvieron a caracterizar cada adenovirus recombinante producido para corroborar que no habían sufrido ninguna alteración en su secuencia durante el proceso, por lo cual se realizó una amplificación gen específica mediante PCR a los adenovirus recombinantes: Ad.IGF-1, Ad.TGF- $\beta$ 1, Ad.FGF-2 y Ad.SOX9, obteniéndose bandas del tamaño esperado para cada caso (Fig. 23). Así mismo se secuenciaron y se comparó la secuencia obtenida con la de referencia para cada gen de los adenovirus recombinantes (Fig. 24) donde se observa que la similitud entre las secuencias comparadas fue del 99 al 100%.



**Figura 19.** Productos de amplificación gen específico por PCR de los adenovirus recombinantes producidos. Se observan geles de agarosa al 2% con los productos de la PCR de los adenovirus recombinantes producidos portadores de los factores de interés, los tamaños de las bandas de los productos corresponden con los esperados para cada gen.

Sequences producing significant alignments:								AdV SOX9	
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links		
<a href="#">NG_012490.1</a>	Homo sapiens SRY (sex determining region Y)-box 9 (SOX9), RefSeq	599	599	100%	4e-168	99%	<a href="#">G</a>		
<a href="#">NM_000346.3</a>	Homo sapiens SRY (sex determining region Y)-box 9 (SOX9), mRNA	599	599	100%	4e-168	99%	<a href="#">U</a> <a href="#">E</a> <a href="#">G</a> <a href="#">M</a>		
<a href="#">AB384876.1</a>	Synthetic construct DNA, clone: pF1KB3946, Homo sapiens SOX9 qe	599	599	100%	4e-168	99%	<a href="#">U</a> <a href="#">E</a> <a href="#">G</a>		
<a href="#">BC007951.2</a>	Homo sapiens SRY (sex determining region Y)-box 9, mRNA (cDNA cl	599	599	100%	4e-168	99%	<a href="#">U</a> <a href="#">E</a> <a href="#">G</a>		
<a href="#">BT007563.1</a>	Synthetic construct Homo sapiens SRY (sex determining region Y)-b	599	599	100%	4e-168	99%	<a href="#">U</a> <a href="#">E</a> <a href="#">G</a>		

Sequences producing significant alignments:								AdV FGF-2	
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links		
<a href="#">NM_002026.4</a>	Homo sapiens fibroblast growth factor 2 (basic) (FGF2), mRNA	1604	1604	98%	0.0	100%	<a href="#">U</a> <a href="#">E</a> <a href="#">G</a> <a href="#">M</a>		
<a href="#">BC166646.1</a>	Synthetic construct Homo sapiens clone IMAGE:100066372, MGC:19	1598	1598	97%	0.0	100%	<a href="#">G</a> <a href="#">E</a> <a href="#">G</a> <a href="#">M</a>		
<a href="#">J04513.1</a>	Human basic fibroblast growth factor (bFGF) 22.5 kd, 21 kd and 18 k	1585	1585	98%	0.0	99%	<a href="#">U</a> <a href="#">E</a> <a href="#">G</a>		
<a href="#">NM_001102411.1</a>	Pan troglodytes fibroblast growth factor 2 (basic) (FGF2), mRNA >gt	1574	1574	98%	0.0	99%	<a href="#">G</a>		
<a href="#">XM_002815126.1</a>	PREDICTED: Pongo abelii hypothetical protein LOC100459751 (LOC10	1543	1543	98%	0.0	98%	<a href="#">G</a> <a href="#">M</a>		

Sequences producing significant alignments:								AdV IGF-1	
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links		
<a href="#">BC160082.1</a>	Synthetic construct Homo sapiens clone IMAGE:100064018, MGC:19	854	854	96%	0.0	100%	<a href="#">G</a>		
<a href="#">AK312231.1</a>	Homo sapiens cDNA, FLJ92522, Homo sapiens insulin-like growth fact	854	854	96%	0.0	100%	<a href="#">U</a> <a href="#">G</a>		
<a href="#">NM_000618.3</a>	Homo sapiens insulin-like growth factor 1 (somatomedin C) (IGF1), t	854	854	96%	0.0	100%	<a href="#">U</a> <a href="#">E</a> <a href="#">G</a> <a href="#">M</a>		
<a href="#">BC152321.1</a>	Homo sapiens insulin-like growth factor 1 (somatomedin C), mRNA (c	854	854	96%	0.0	100%	<a href="#">U</a> <a href="#">G</a>		
<a href="#">XM_001156521.1</a>	PREDICTED: Pan troglodytes similar to insulin-like growth factor I pre	854	854	96%	0.0	100%	<a href="#">G</a> <a href="#">M</a>		

Sequences producing significant alignments:								AdV TGF-β1	
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links		
<a href="#">NM_000660.4</a>	Homo sapiens transforming growth factor, beta 1 (TGFB1), mRNA	2167	2167	99%	0.0	100%	<a href="#">U</a> <a href="#">E</a> <a href="#">G</a> <a href="#">M</a>		
<a href="#">CR612251.1</a>	full-length cDNA clone CS0DD009YM06 of Neuroblastoma Cot 50-non	2167	2167	99%	0.0	100%	<a href="#">U</a> <a href="#">G</a>		
<a href="#">CR601792.1</a>	full-length cDNA clone CS0DL010YL07 of B cells (Ramos cell line) Cot	2167	2167	99%	0.0	100%	<a href="#">U</a> <a href="#">G</a>		
<a href="#">AK291902.1</a>	Homo sapiens cDNA FLJ75750 complete cds, highly similar to Homo s	2161	2161	99%	0.0	99%	<a href="#">U</a> <a href="#">E</a> <a href="#">G</a>		
<a href="#">BC001180.1</a>	Homo sapiens transforming growth factor, beta 1, mRNA (cDNA clone	2161	2161	99%	0.0	99%	<a href="#">U</a> <a href="#">E</a> <a href="#">G</a>		

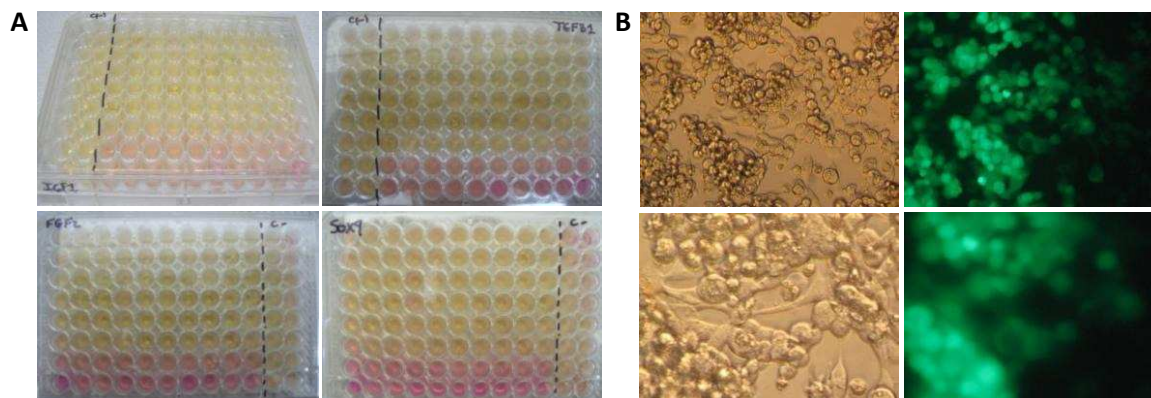
**Figura 20.** Secuenciación de los adenovirus recombinantes producidos. Se secuenciaron los factores que portaban cada uno de los adenovirus recombinantes producidos, y se comparó la secuencia obtenida con la de referencia para cada gen mediante el programa Blast, se puede observar en los resultados arrojados por el Blast que la similitud entre las secuencias comparadas fue del 99 al 100%.

### 6.3.2. Cuantificación de vectores adenovirales

Los nuevos vectores adenovirales producidos para cada uno de los factores de interés: Ad.IGF-1, Ad.TGF-β1, Ad.FGF-2, Ad.SOX9 y Ad.GFP, fueron cuantificados mediante dos métodos diferentes: 1. Método O.D. 260nm (VP/mL), este método es simple, se basa en la evaluación espectrofotométrica de partículas virales totales en solución correlacionado al contenido de DNA, el coeficiente de correlación es de  $1.1 \times 10^{12}$  virus por unidad OD<sub>260</sub>. 2. Método “Tissue culture infectious dose 50 (TCID<sub>50</sub>)”, este método está basado en el desarrollo del efecto citopático en células Hek-293 utilizando diluciones de punto final para estimar el título (Fig.23). Los resultados de ambos métodos para la cuantificación de los vectores adenovirales obtenidos, se encuentran resumidos en la tabla 4.

**Tabla 5.** Cuantificación de los vectores adenovirales obtenidos.

Vector Adenoviral	O. D. 260nm (VP/mL)	Titulación (PFU/mL)
Ad.GFP	$3.8537 \times 10^{11}$	$8 \times 10^7$
Ad.IGF-1	$3.18725 \times 10^{11}$	$5 \times 10^9$
Ad.TGF- $\beta$ 1	$7.436 \times 10^{11}$	$1 \times 10^9$
Ad.FGF-2	$3.924 \times 10^{11}$	$4 \times 10^9$
Ad.SOX9	$4.7153 \times 10^{11}$	$3 \times 10^8$

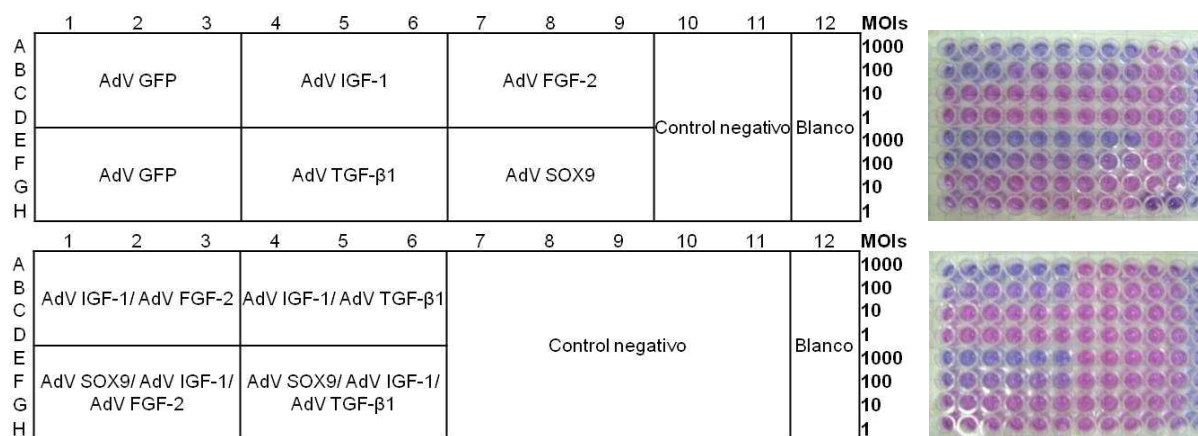


**Figura 21.** Cuantificación de los vectores adenovirales mediante el método de TCID50. (A) Placas de titulación para los vectores adenovirales Ad.IGF-1, Ad.TGF- $\beta$ 1, Ad.FGF-2, Ad.SOX9 y Ad.GFP. (B) Imagen al 20X de los cultivos en la placa de titulación de las células transfectadas con Ad.GFP, al día 10.

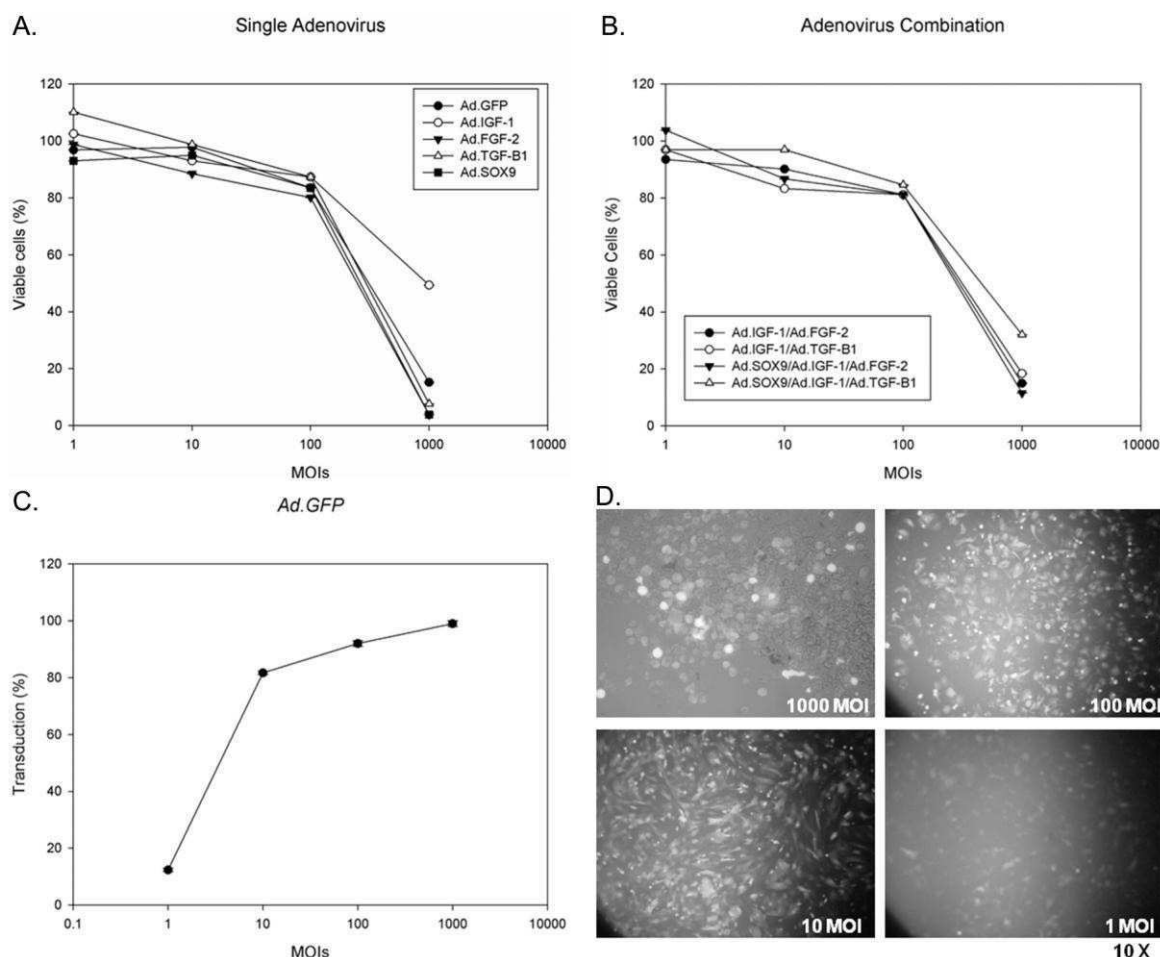


#### 6.4. Viabilidad celular y eficiencia de transducción de las CMMs con vectores adenovirales

Para determinar la concentración adenoviral a la cual las CMMs adherentes pueden ser modificadas genéticamente con 1, 2 o 3 vectores adenovirales en cultivo de alta densidad sin comprometer su viabilidad, el primer pasaje de cultivo de CMMs en monocapa fue transducido con Ad.IGF-1, Ad.TGF- $\beta$ 1, Ad.FGF-2, o Ad.SOX9 recombinantes solos o en combinación a una dosis viral total de 1, 10, 100 o 1000 MOIs, como se indica en la sección de material y métodos; la combinación de los vectores se realizó en proporción 1:1 y 1:1:1 para la combinación de 2 y 3 vectores, respectivamente. Los grupos control consistieron en cultivos de CMMs nativos y transducidos con dosis equivalentes del vector adenoviral Ad.GFP. El primer pasaje de cultivos de CMMs en monocapa fueron también transducidos con las mismas dosis virales en incremento de Ad.GFP para proveer de una comparación relativa en la eficiencia de transducción. Después de 72 h, un mayor porcentaje de CMMs parecieron estar transducidas por el adenovirus en cada dosis. Consistente con el cultivo de CMMs, células GFP-positivas aparecieron con la morfología típica de fibroblasto. Se seleccionó la concentración de 100 MOIs para transducir las CMMs debido a que a esta dosis había un alto nivel de transducción (arriba del 90%) y había también una viabilidad celular arriba del 80% (Fig. 26 y 27).



**Figura 22.** Ensayos de Viabilidad Celular (día 20). A la izquierda de la imagen se observa el mapa, en las placas de 96-pozos, del orden en cómo fueron cultivadas las CMMs en monocapa y transducidas con los adenovirus recombinantes solos (placa superior izq.) y en combinación (placa inferior izq.), los cuales se cultivaron durante 20 días al termino de los cuales se les midió la viabilidad celular mediante el ensayo con azul alamar, mismo que se puede observar en la parte derecha de la imagen para ambas placas.



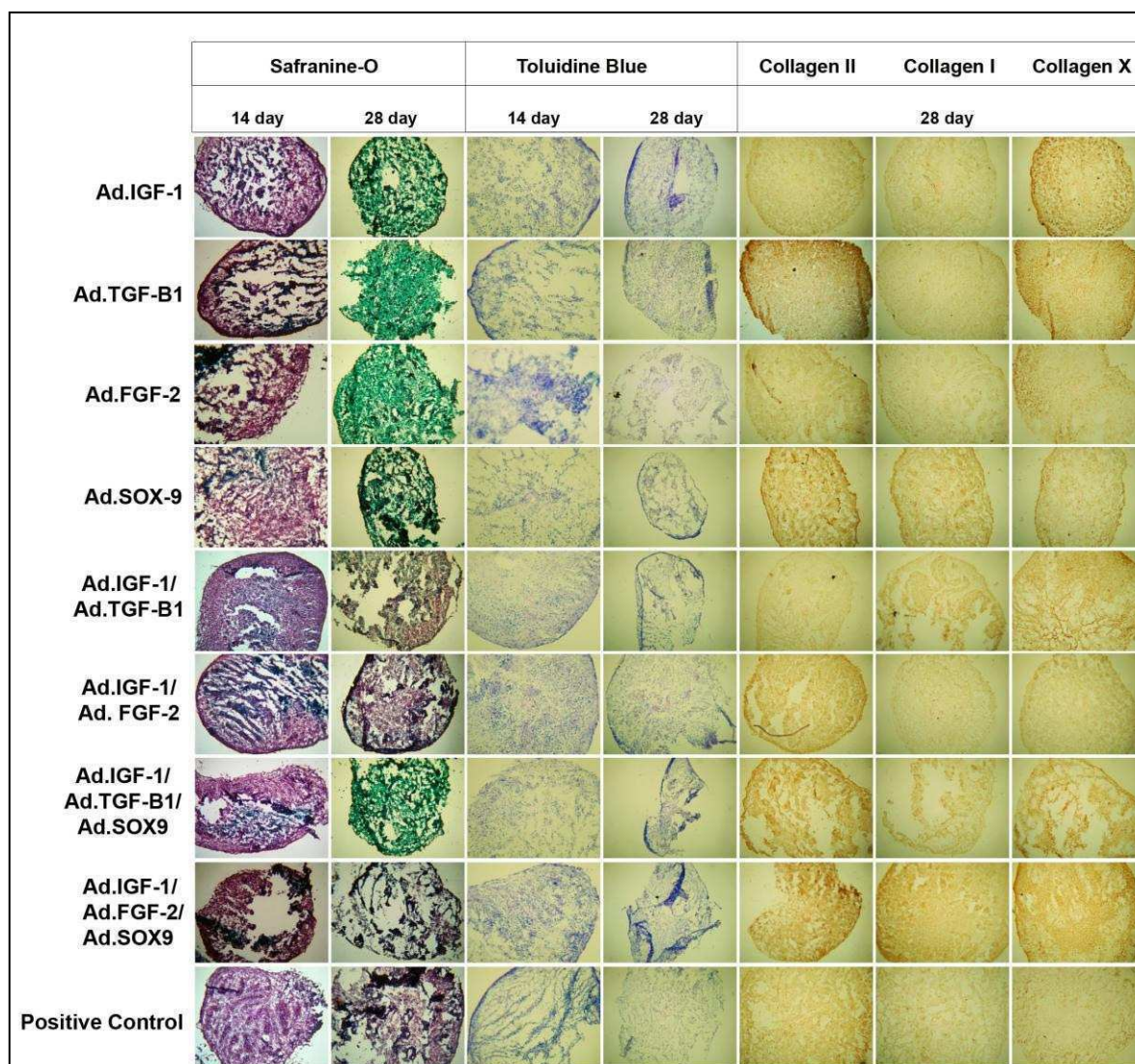
**Figura 23.** Viabilidad de las CMMs con transducción adenoviral simple y combinada. CMMs en monocapa fueron transducidas con dosis en incremento de Ad.GFP, Ad.IGF-1, Ad.TGF-β1, Ad.FGF-2 y Ad.SOX9 solos (A.) y en combinación (B.). Al día 10, la viabilidad celular fue medida mediante el ensayo de azul alamar; los valores a OD570-600 nm de células no transducidas fueron fijados como 100%. Los datos se expresan como el promedio con error estándar de tres experimentos. (C.) A las 72 horas, células GFP+ fueron contadas en tres campos en microscopio bajo luz visible y fluorescencia. Los resultados son presentados como el porcentaje promedio de células fluorescentes por campo en cada dosis viral. (D.) Fluorescencia representativa de CMMs transducidas con 1, 10, 100 y 1000 MOIs de Ad.GFP, como está indicado.

### 6.5. Diferenciación condrogénica de CMMs después de la transducción adenoviral de IGF-1, TGF-β1, FGF-2 y SOX9 solos o en combinación.

Para determinar los niveles de expresión relativa de los transgenes, cultivos paralelos de CMMs fueron transducidos con 100 MOIs de Ad.IGF-1, Ad.TGFβ-1, Ad.FGF-2 y Ad.SOX9 solos o en combinación; por cada grupo experimental, la expresión de los transgenes fue decreciendo a través del tiempo (3, 14 y 28 días) (Datos no mostrados). Debido a que las CMMs mostraron ser capaces de mantener la expresión de 2 o 3 transgenes anabólicos diferentes después de la transducción

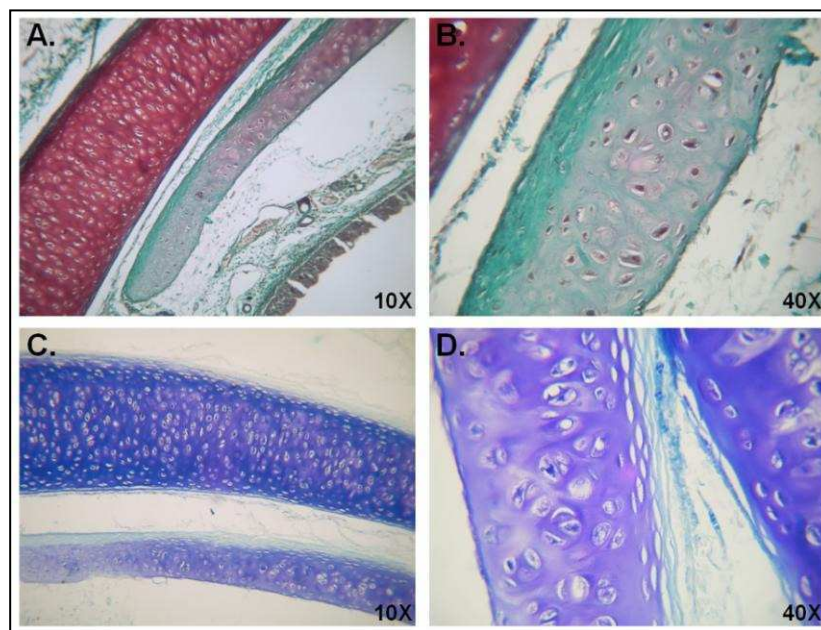
mediada por adenovirus, se analizaron los efectos in vitro de la co-expresión de los factores de crecimiento en la condrogénesis de los agregados de CMMs. El segundo pasaje de cultivos de CMMs en monocapa ( $7.6 \times 10^5$  CMMs) fueron transducidos con 100 MOIs de Ad.IGF-1, Ad.TGF- $\beta$ 1, Ad.FGF-2, y Ad.SOX9 solos o en combinación, todo se hizo por triplicado; siguiendo la transducción, los fluidos del cultivo fueron aspirados y reemplazados con un medio suplementado, las células comenzaron a formar agregados esféricos después de 3 días de cultivo, cultivándose en ese estado por 28 días; levantándose al día 14 y 28 para ser analizadas. La examinación histológica indicó evidencia de condrogénesis de las CMMs gen-inducidas, los agregados que recibieron Ad.FGF-2 en combinación con Ad.IGF-1 tuvieron una mayor respuesta condrogénica que los agregados que recibieron los adenovirus solos (Ad.IGF-1, Ad.TGF- $\beta$ 1, Ad.FGF-2, Ad.SOX9) o en otra combinación (Ad.IGF-1/Ad.TGF- $\beta$ 1, Ad.IGF-1/Ad.TGF- $\beta$ 1/Ad.SOX9, Ad.IGF-1/Ad.FGF-2/Ad.SOX9), demostrándose esto por la producción de COL II, y PGCs (Fig. 28). En los ensayos histológicos se observó que la co-transducción de IGF-1 y FGF-2 llevó a la formación de agregados de mayor tamaño y celularidad, y de un mayor depósito de PGCs a los días 14 y 28, como está indicado por las tinciones de Safranin-O/fast green y azul de toluidina, las cuales evidencian una organización espacial de PGCs cargados negativamente con una coloración de naranja a rojo, y con una coloración de violeta a púrpura, respectivamente. Los ensayos inmunohistoquímicos para la combinación de IGF-1 y FGF-2, revelaron la presencia de COL II (indicado por una inmunotinción prominente y uniforme en el agregado) característico de la matriz de cartílago e indicador de un fenotipo similar a condrocito; COL I con una baja pero detectable inmunotinción, indicando la presencia de una matriz fibrosa relacionada con osificación; y la presencia de COL X, un marcador de condrocitos hipertróficos lo cual indica el término de la diferenciación condrogénica (Fig. 28). Un tono verde fue apreciado en la tinción de safranina-O al día 28 en los otros grupos evaluados, a pesar de esto, uno no puede descartar la posibilidad de que las CMMs estuvieran siendo diferenciadas a cartílago, debido a que en la misma tinción realizada a un cartílago hialino de tráquea se vio que el cartílago maduro se tiñó de rojo pero el cartílago inmaduro o en neo-formación se tiñó verde; esto nos permite concluir que la tinción verde podría deberse a un estado de inmadurez en el cartílago en formación (Fig. 29). Aunque la evidencia fenotípica de los condrocitos no fue mayor en los otros grupos evaluados, los agregados transducidos con Ad.TGF- $\beta$ 1 mostraron una prominente inmunotinción para COL II principalmente pericelular, y una baja inmunotinción para COL I, por lo que es un candidato interesante, aunque mostró una inmunotinción prominente para COL X. No se observó gran diferencia en las inmunotinciones entre los agregados co-

transducidos con Ad.FGF-2 y Ad.IGF-1, y el control positivo. La naturaleza cualitativa de la prueba no nos permitió hacer un análisis estadístico.



**Figura 24.** Condrogénesis de CMMs por transferencia génica mediada por adenovirus. Cultivos de CMMs en monocapa fueron transducidas con 100 MOIs de Ad.IGF-1, Ad.TGF-β1, Ad.FGF-2 y Ad.SOX9 solos o en combinación, posteriormente se formaron en agregados al día 3 de cultivo. Los agregados fueron cultivados por 28 días y levantados al día 14 y 28, así mismo CMMs no transducidas fueron cultivadas en paralelo como controles positivos. Las tinciones de safranina-O/fast green y azul de toluidina fueron utilizados para la detección de la matriz de PGCs en secciones representativas del agregado, e inmunotinciones fueron utilizadas para la detección de colágenos; la presencia de COL II indicó un fenotipo tipo condrocitos; COL I indicó una matriz fibrosa; y COL X indicó la presencia de condrocitos hipertróficos indicadores del término de la diferenciación condrogénica.





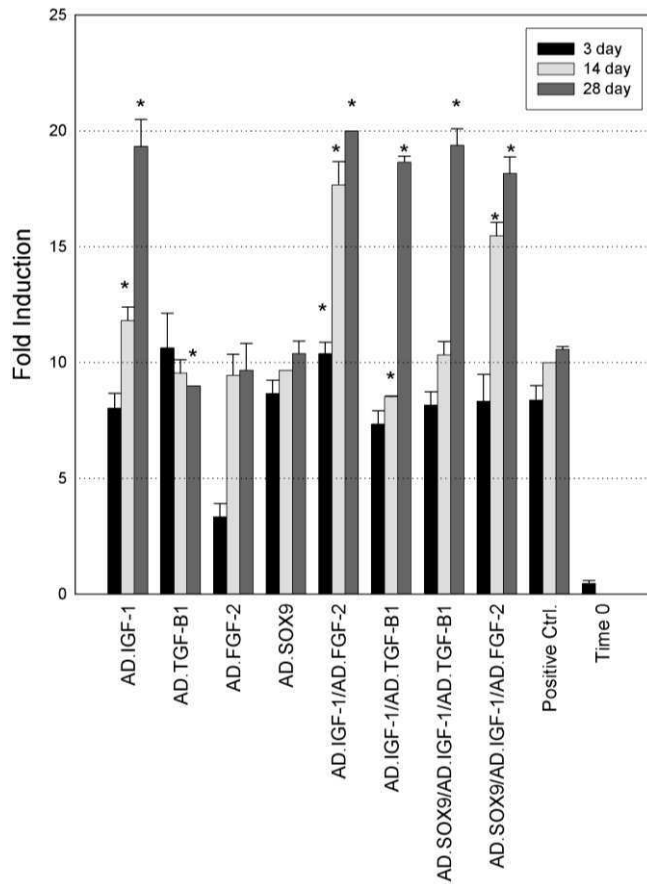
**Figura 25.** Cartílago hialino de traquea humana. Se observa un cartílago hialino teñido con safranina-O/fast green a 10X (A.) y 40X (B.), en el cual se aprecia que el cartílago maduro se tiño de rojo pero el cartílago inmaduro o en neo-formación se tiño de verde. El cartílago hialino teñido con azul de toluidina a 10X (C.) y 40X (D.) muestra el desplegado de la organización espacial de los PGCs cargados negativamente a lo largo de la matriz cartilaginosa.

## 6.6. Expresión génica de los marcadores condrogénicos a través del tiempo

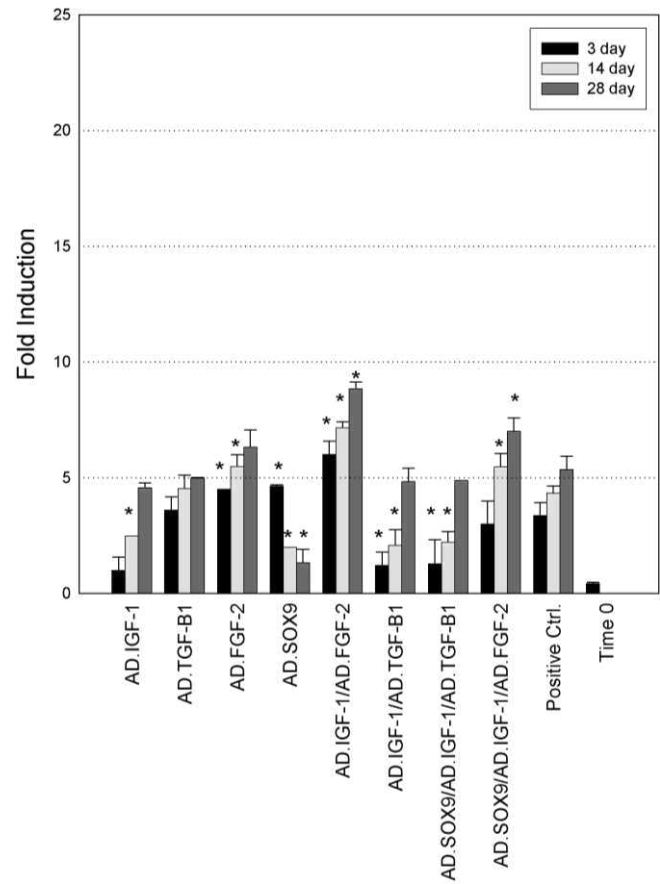
A fin de examinar el aparente efecto sinérgico de la co-entrega de FGF-2 e IGF-1 en la diferenciación condrogénica de CMMs cultivadas en agregados, se analizaron los perfiles de expresión temporal de genes asociados con la diferenciación condrogénica y osteogénica. A los días 3, 14, y 28, agregados (n=3) de cada grupo (CMMs transducidas con los adenovirus recombinantes solos o en combinación) fueron cosechados, mezclados, y analizados mediante qRT-PCR (Fig. 30). Cultivos en agregados de CMMs diferenciadas a condrocitos mediante un medio comercial establecido y cultivos en monocapa de CMMs recién transducidas con Ad.GFP (Tiempo 0), fueron utilizados como controles positivos y negativos, respectivamente. Consistente con los análisis previos, todos los grupos de estudio mostraron evidencia de diferenciación condrogénica a nivel de RNA. El grupo de agregados transducidos con Ad.FGF-2 y Ad.IGF-1 mostraron una diferencia con el resto de los grupos de estudio desde tiempos de observación tempranos. Particularmente al día 3 se observó una expresión significativa para AGC, BGC, CM, PGC y COL II con respecto al control positivo ( $P= 0.012, 0.005, <0.001, 0.006$  y  $0.958$ , respectivamente) y éstos genes mantuvieron sus valores de expresión significativos a niveles altos en todos los puntos medidos a través del tiempo, siendo más remarcado al día 28. Si bien los agregados transducidos con Ad.FGF-2/Ad.IGF-1 fueron

también significativos en su expresión para COL I al día 3, éste disminuyó de manera constante a través del tiempo y llegó a ser el más bajo que en el resto de los grupos al día 28, con excepción de los agregados transducidos con Ad.FGF-2. La expresión del mRNA de COL X en el grupo de Ad.IGF-1/Ad.FGF-2 fue muy similar al control positivo con mayor expresión únicamente al día 14. Otros grupos de agregados que mostraron una fuerte evidencia de diferenciación condrogénica a nivel de RNA fueron aquellos transducidos con Ad.IGF-1 o co-transducidos con Ad.IGF-1/Ad.TGF- $\beta$ 1, Ad.SOX9/Ad.IGF-1/Ad.TGF- $\beta$ 1, y Ad.SOX9/Ad.IGF-1/Ad.FGF-2, con el inconveniente de que a pesar de que mostraron una alta expresión sostenida de AGC, BGC, CM, PGC y COL II, también se observó en ellos una marcada alta expresión mantenida para COL I y X. Para confirmar los resultados obtenidos mediante inmunohistoquímica y qRT-PCR, se realizó la detección de COL I, II, y X mediante ensayos de western blot en CMMs transducidas con Ad.IGF-1/Ad.FGF-2 al día 28. Demostrando el análisis densitométrico un incremento en la expresión de COL II (3 fold de incremento comparado con el control positivo), mientras que la expresión de COL I y X fue indetectable y limitada, respectivamente (Figura 32). Nuestros resultados sugieren que la co-expresión de IGF-1/FGF-2 acelera y potencia el proceso de condrogénesis.

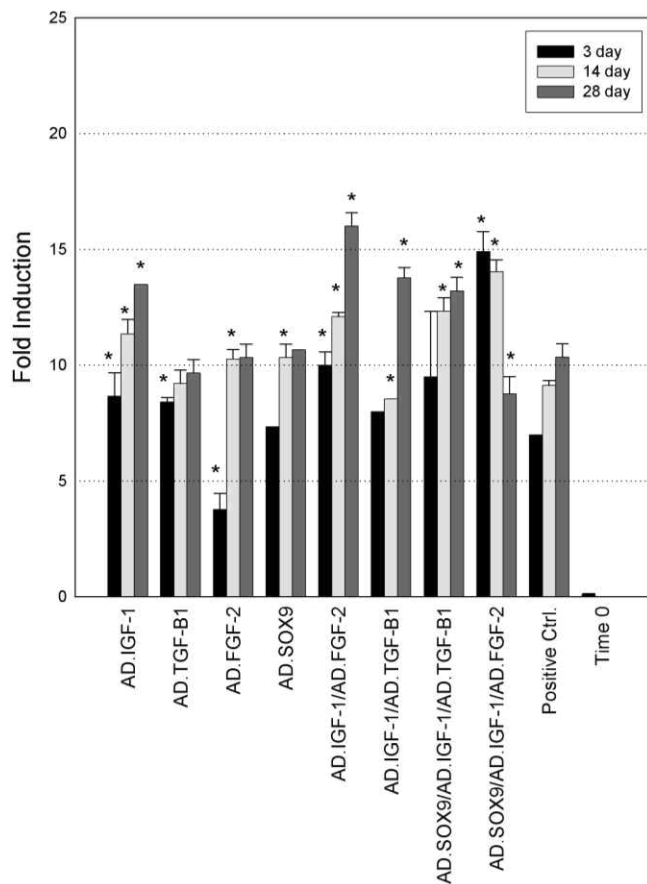
Aggrecan



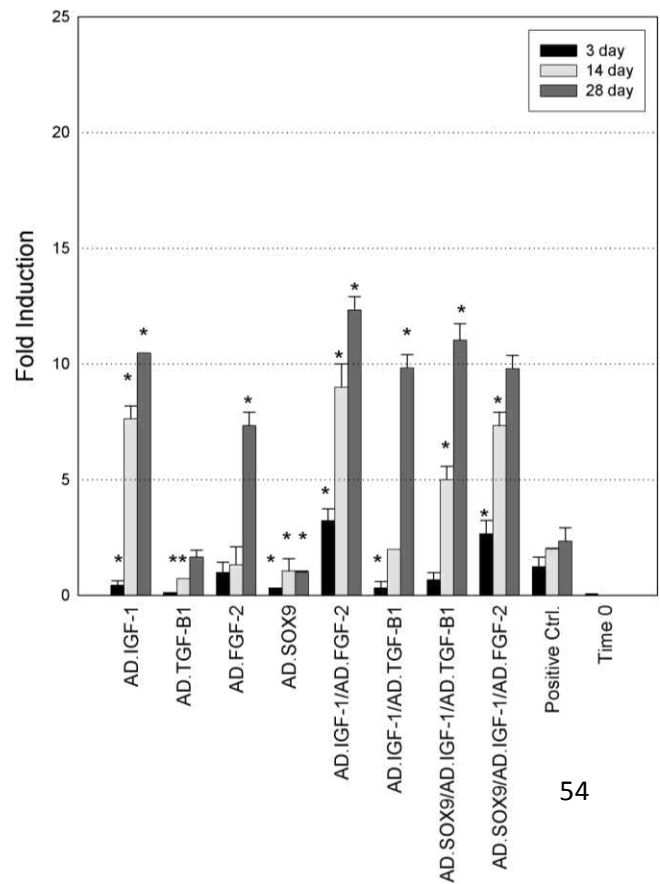
Biglycan



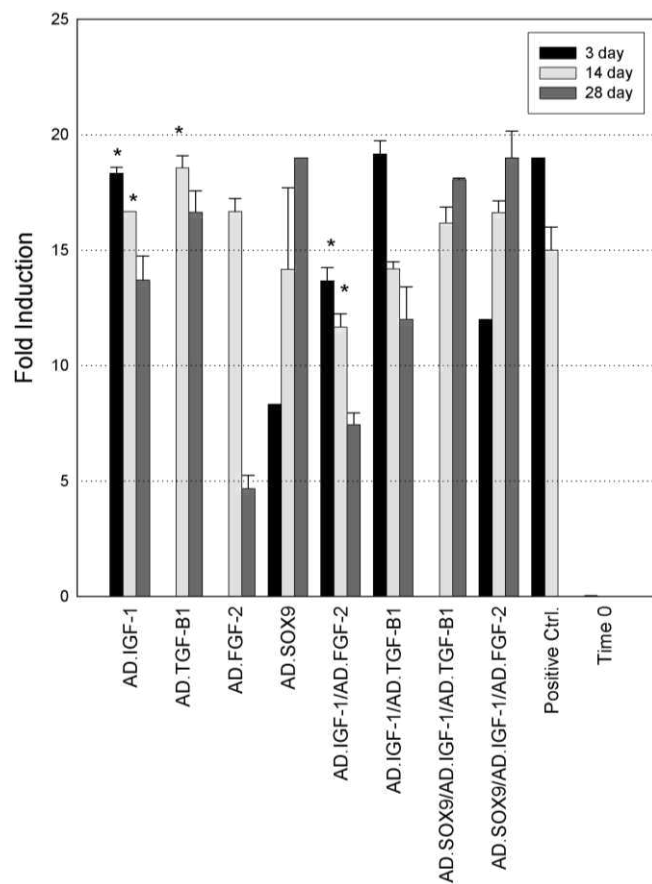
Cartilage Matrix



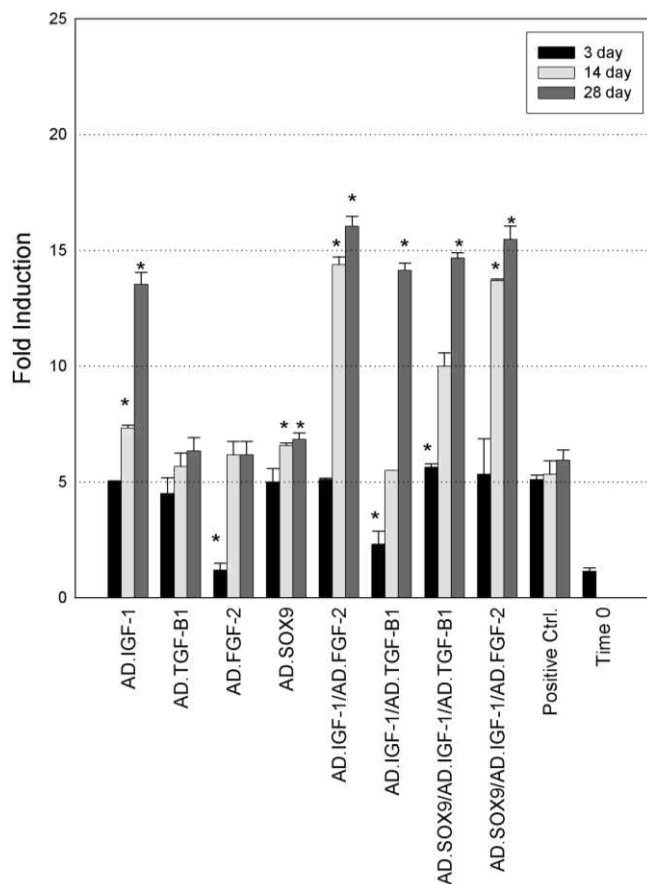
Proteoglycan



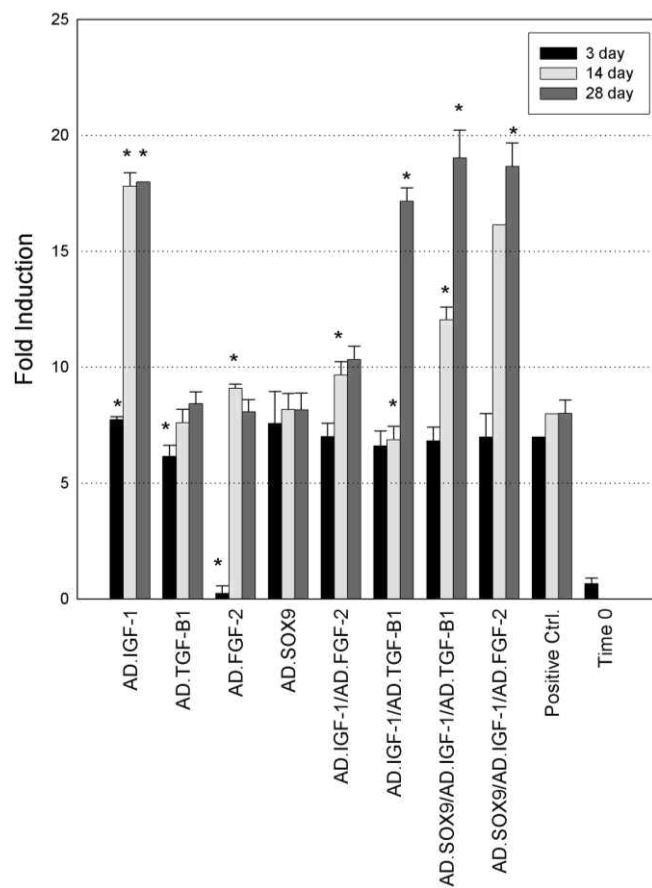
Collagen I



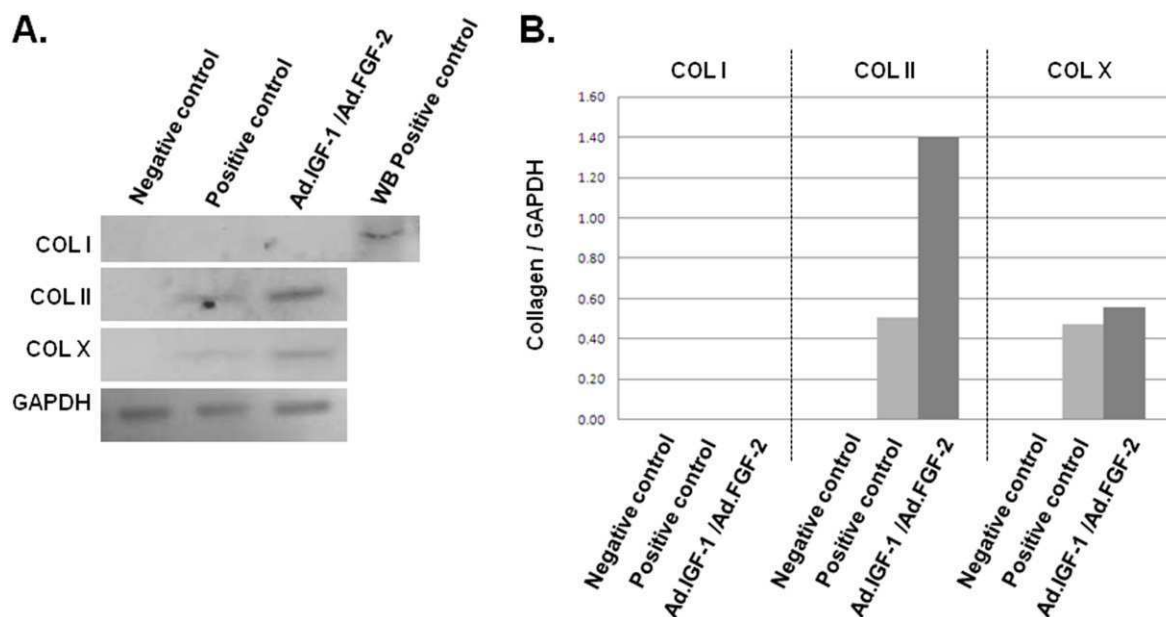
Collagen II



Collagen X



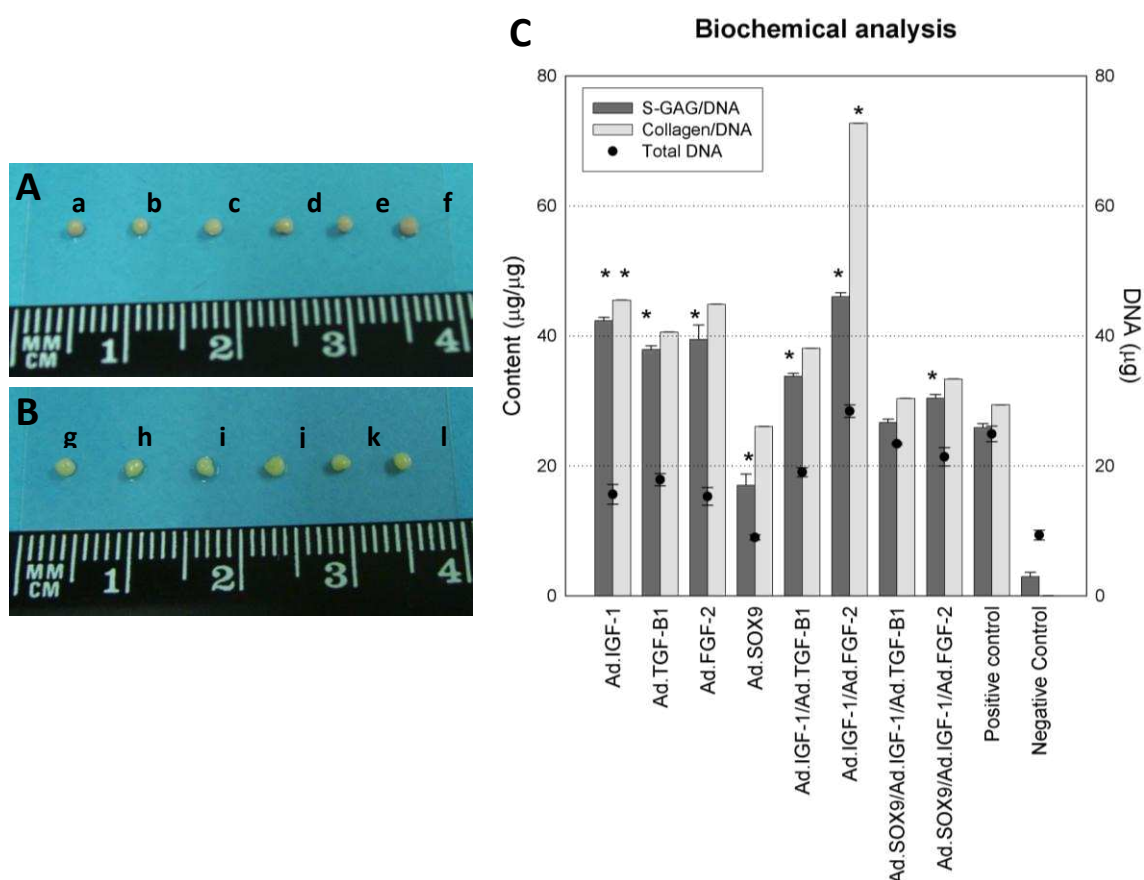
**Figura 26.** Expresión génica de marcadores condrogénicos en cultivos de agregados de CMMs modificadas genéticamente. Las CMMs fueron transducidas con 100 MOIs de los vectores adenovirales respectivos como está indicado, fueron cultivadas en agregados, y mantenidas en un medio definido libre de suero durante 3, 14, o 28 días. Por cada grupo de tratamiento y tiempo indicado, el RNA fue extraído de 3 agregados, y la expresión de genes marcadores cartílago específicos COL I, COL II, COL X, AGC, BGC, CM, y PGC fue determinada mediante qRT-PCR. El RNA aislado de CMMs diferenciadas mediante un medio comercial establecido y el RNA extraído inmediatamente de CMMs recién transducidas con Ad.GFP (Tiempo 0), fueron utilizados como controles comparativos positivo y negativo, respectivamente. Las secuencias de los primers, tamaño de los productos, y las temperaturas de alineamiento para COL I, COL II, COL X, AGC, BGC, CM, y PGC están listados en la Tabla 1. Los niveles de expresión de cada gen blanco fueron normalizados con el gen endógeno GAPDH. Los valores están expresados como niveles de inducción correspondiente a la media con desviación estándar de los niveles de expresión normalizados. Diferencias estadísticas entre los grupos de estudio y el control positivo fueron analizados utilizando la prueba t de student, las diferencias fueron consideradas significativas cuando  $p < 0.05$  (\*).



**Figura 27.** Western blot y análisis densitométrico. (A.) Análisis de Western blot al día 28 post-transducción para la expresión in vitro de COL I, II y X. (B.) Análisis densitométrico ilustrando el ratio de expresión de colágeno/GAPDH (Phoretix 1D software). CMMs transducidas con Ad.IGF-1/Ad.FGF-2 (50 MOIs por cada vector) mostraron casi 3-fold de incremento en la expresión de COL II comparado con el control positivo. Similarmente la baja expresión de COL X fue observada en CMMs transducidas con adenovirus y el control positivo. La expresión de COL I fue indetectable en los grupos experimentales. WB: El control positivo para COL I fue un cultivo de osteoblastos.

## **6.7. Ensayos bioquímicos para la determinación del contenido de DNA, GAGs y Colágeno.**

Agregados representativos, uno por cada grupo (n=3) de estudio, son presentados en la figura 31A y 31B; en ellos se observa que los agregados co-transducidos con Ad.IGF-1/Ad.FGF-2 fueron los más grandes de tamaño en comparación con los otros grupos estudiados y los controles positivos; aunque los agregados transducidos con Ad.IGF-1 estuvieron muy cercanos de igualar el tamaño en milímetros y fueron más uniformes en su superficie. Para comparar cuantitativamente la síntesis de matriz extracelular entre los grupos de estudio, los niveles de GAGs y colágeno en los agregados después del día 28 de cultivo fueron determinados y normalizados con el contenido de DNA total. Los agregados co-transducidos con Ad.IGF-1/Ad.FGF-2 mostraron una producción significativamente mayor de GAGs y colágenos con respecto al control positivo ( $P = <0.001$ ); y una mayor cantidad de DNA (número de células), GAGs y colágenos,  $28.438 \pm 0.943$ ,  $46.064 \pm 0.587$ , y  $72.744 \pm 0.005$  respectivamente, con respecto a los otros grupos de estudio (Figura 31C). Los cultivos transducidos con Ad.GFP no formaron agregados (control negativo), y no mostraron evidencia fenotípica de condrogénesis. Estos hallazgos corresponden con lo observado en el tamaño de los agregados y se correlacionan con los hallazgos histológicos e inmunohistoquímicos respectivos (Figuras 28, 31A y 31B).



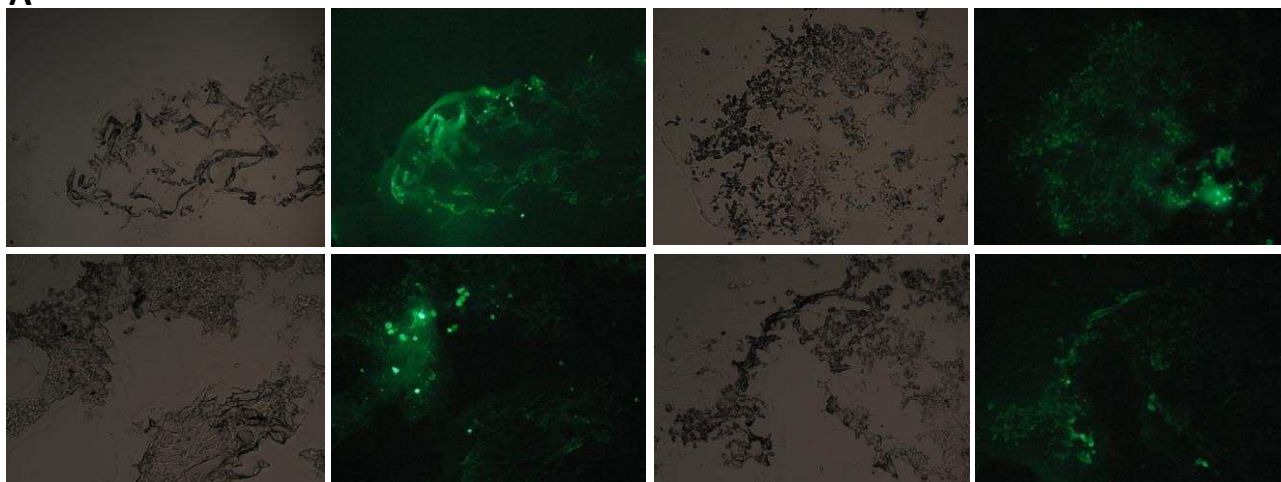
**Figura 28.** Tamaño y forma de los agregados y análisis bioquímico. Se presentan las imágenes de los agregados representativos de cada grupo estudiado. (A.) Agregados transducidos con vectores adenovirales simples correspondientes a controles positivos (a) y (b), Ad.SOX9 (c), Ad.FGF-2 (d), Ad.TGF-β1 (e), y Ad.IGF-1 (f). (B.) Agregados transducidos con combinaciones de vectores adenovirales correspondientes a controles positivos (g) y (h), Ad.IGF-1/Ad.TGF-β1 (i), Ad.IGF-1/Ad.FGF-2 (j), Ad.SOX9/Ad.IGF-1/Ad.TGF-β1 (k) y, Ad.SOX9/Ad.IGF-1/Ad.FGF-2 (l). (C.) Análisis bioquímicos de los agregados in vitro para el contenido de DNA total, GAGs y colágeno sintetizados. El contenido de GAGs y colágeno fueron normalizados mediante el contenido de DNA total para cada muestra. Los datos son presentados como la media  $\pm$  desviación estándar de 3 agregados por grupo (n = 3). \*p<0.05.

## 6.8. Implante de CMMs transducidas con IGF-1/FGF-2 en soporte de alginato.


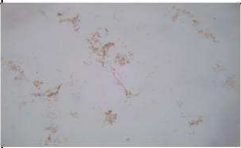
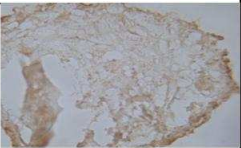






Una vez que se determinó cual era la mejor combinación de factores de crecimiento (IGF-1/FGF-2) que mejor inducían de manera potenciada la diferenciación de las CMMs a condrocitos, se procedió a probar ésta combinación de células y factores en un soporte de alginato para la generación de un implante. Se sembraron 3 implantes por triplicado: 1) un grupo de CMMs no-transducidas sembradas con medio de diferenciación condrogénica (control positivo), 2) un grupo de CMMs transducidas con la combinación AD.IGF-1/Ad.FGF-2 sembradas con medio DMEM suplementado

y 3) un grupo con CMMs transducidas con Ad.GFP sembradas con medio DMEM suplementado (control negativo). A los 28 días de cultivo los soportes fueron retirados de la placa, embebidos en OCT y preparados para pruebas histológicas e inmunohistoquímicas. La observación macroscópica de los implantes representativos de cada grupo evaluado mostró que los implantes tenían una apariencia física y tamaño similar para todos los grupos (Fig. 32B). Como prueba histológica solo se realizaron los cortes y la fijación en laminillas del control negativo, esto para observar la población celular, distribución y apariencia fenotípica mediante la fluorescencia emitida por el Ad.GFP, ya que no se pudieron realizar tinciones que evidenciaran PGCs debido a que tanto los PGCs como el alginato están cargados negativamente por lo que se teñiría tanto la matriz producida por las CMMs como el soporte, impidiéndonos diferenciar unos de otros. En dichas laminillas se pudo apreciar que dentro del soporte la población de CMMs llenaba cerca del 80% de la capacidad del soporte, con una distribución uniformemente a lo largo del mismo (Fig. 32A). Las pruebas inmunohistoquímicas revelaron en el grupo 2, la presencia de COL II y X en mayor cantidad que el control positivo, indicando esto la diferenciación de las CMMs a células con fenotipo condrogénico dentro del soporte aunque llegando al término de la diferenciación por su estado hipertrófico; así mismo se detectó la presencia de COL I con una baja pero detectable inmunotinción en igual intensidad al control positivo, indicando la presencia de una matriz fibrosa relacionada con osificación (Fig. 33). Este soporte de alginato por tener una textura y composición gelatinosa no se pudo adherir y fijar fuertemente al portaobjetos, se despegaba fácilmente, debido a esto las laminillas para realizar este ensayo no estuvieron preparadas de manera optima, a pesar de que se repitieron varias veces, por lo que se requieren de otros ensayos como un ELISA o Western blot para detectar estos marcadores de manera más confiable en la evaluación de la funcionalidad de este soporte.



**A****B**

**Figura 29.** Implante de CMMs modificadas genéticamente en soporte de alginato. (A) Laminillas del implante control negativo, en donde mediante la fluorescencia emitida por el Ad.GFP, se puede observar a 10X que dentro del soporte la población de CMMs llenaba cerca del 80% de la capacidad del soporte, con una distribución uniformemente a lo largo del mismo. (B) Observación macroscópica de los implantes representativos de cada grupo evaluado, en la imagen se observa que los implantes tenían una apariencia física y tamaño similar en todos los grupos.

Implante	Colágeno II	Colágeno I	Colágeno X
Ad.IGF-1/Ad.FGF-2			
Control Positivo			
Control Negativo			

**Figura 30.** Ensayo inmunohistoquímico realizado a implantes de CMMs modificadas genéticamente en soporte de alginato. Se observa, en el implante con CMMs transducidas con Ad.IGF-1/Ad.FGF-2, la presencia de COL II y X en mayor cantidad que el control positivo, indicando esto la diferenciación de las CMMs a células con fenotipo condrogénico dentro del soporte aunque llegando al término de la diferenciación por su estado hipertrófico; así mismo se detectó la presencia de COL I con una baja pero detectable inmunotinción en igual intensidad al control positivo, indicando la presencia de una matriz fibrosa relacionada con osificación.

## 7. Discusión

Estudios previos han demostrado que las CMMs primarias cultivadas en agregados se diferencian in vitro a condrocitos después de modificaciones genéticas con factores condrogénicos establecidos, como TGF- $\beta$ 2, BMP-2, IGF-1, y TGF- $\beta$ 1 y por inducción en la expresión de Sox9, siendo esto aplicable a la reparación del cartílago in vivo [25-28]. En el presente trabajo, nosotros adaptamos el cultivo en agregados de CMMs ovinas, para determinar si la entrega adenoviral simple o en combinación de múltiples factores transcripcionales y de crecimiento, podrían permitir una condrogénesis eficiente in vitro.

La utilización de CMMs representa una alternativa viable a los condrocitos articulares dentro de las estrategias para la reparación del CA. Las CMMs pueden ser identificadas y caracterizadas por la expresión de sus antígenos de superficie, sin embargo, actualmente no existen marcadores únicos y específicos para este tipo de células, y han sido inadecuadamente descritos para ovejas, por lo que nosotros iniciamos el estudio implementando algunos ensayos para caracterizar las CMMs ovinas. Los marcadores asociados con y sugeridos para definir posibles CMMs son: CD73 (hecto 5'-nucleotidasa), CD90 (antígeno celular de superficie Thy-1), CD105 (Endogлина), CD166 (Alcam), CD271 (receptor del factor de crecimiento nervioso), y MSCA-1 (antígeno de células estromales mesenquimales-1) como positivamente expresados, y CD14 (molécula CD14), CD34 (molécula CD34), CD45 (proteína tirosina fosfatasa, receptor tipo C), y CD117 (v-kit Hardy-Zuckerman 4 homologo al oncogen viral del sarcoma felino) como no expresados [45, 98]. En el inmunofenotipo realizado al primer pasaje de CMMs aisladas, la expresión de CD45 fue detectado en porcentaje bajo, esto podría ser explicado por la presencia de antígenos de superficie remanentes después del primer pasaje, ya que ha sido reportado que CD45 es un marcador positivo en el aislamiento, pero se pierde en cultivo [100]. La baja amplificación de CD14 en RT-PCR y qRT-PCR pudiera ser explicada por la presencia de otras células adherentes (fibroblastos, estromales, o monocitos), y/o linfocitos y leucocitos que podrían no haber sido completamente removidos del cultivo primario [101]. Estos resultados demostraron un aislamiento exitoso de CMMs y con ello reportamos un método más completo para la caracterización de CMMs en esta especie.

En este estudio, se analizó la condrogénesis in vitro de las CMMs mediante transferencia génica combinada utilizando vectores adenovirales, éstos últimos proveen de una tecnología útil para examinar el potencial condrogénico de IGF-1, TGF- $\beta$ 1, FGF-2, y SOX9 solos o en combinación, debido a que permite la expresión del transgen durante un largo periodo tiempo, lo cual es crítico

para potenciar la diferenciación de las CMMs hacia condrocitos y el mantenimiento del fenotipo condrogénico mejor que una alta dosis inicial de la proteína recombinante [102].

Para buscar diferenciación condrogénica de las CMMs transducidas con los diferentes factores de transcripción y crecimiento seleccionados, fueron utilizadas CMMs cultivadas en agregados debido a que este tipo de cultivo remeda el proceso de condensación celular durante la formación del cartílago, con alta densidad celular espacial y contacto célula-célula, además de que es utilizado frecuentemente como un método para el entendimiento de cómo la interacción de las células, factores de crecimiento y factores medioambientales, promueven un fenotipo condrogénico [103]. En este trabajo se optimizó exitosamente el método tradicional para la preparación de cultivos en agregados; para promover la formación del agregado, se sembraron las CMMs directamente en una placa de 6-pozos, y sin tripsinizar las células, ni centrifugarlas en un tubo cónico de polipropileno de 15 mL, cambiamos el medio por el medio suplementado condrogénico correspondiente y se incubó en condiciones apropiadas, después de tres días se comenzaron a formar agregados esféricos solos. Éste método modificado es simple, economiza dinero y reactivos, minimiza la manipulación y es compatible con la condrogénesis de CMMs.

Este estudio es parte de una evaluación preclínica de métodos experimentales para el tratamiento y reparación del cartílago, por esta razón se seleccionó al borrego como modelo animal grande para el aislamiento de las CMMs, el borrego tiene mayor similitud anatómica con el humano, por lo que las terapias experimentales resultantes pueden ser extrapoladas a la reparación del daño musculoesquelético, y además el borrego tiene la ventaja de que al permanecer de pie tiene la rodilla más extendida que en otras especies animales para experimentos in vivo [102].

En el presente estudio, demostramos que la sobre-expresión combinada de IGF-1 y FGF-2 en las CMMs vía transferencia génica mediada por adenovirus, potenció significativamente la diferenciación condrogénica después de 28 días en un sistema de cultivo de agregado in vitro, más que con IGF-1, FGF-2, TGF-B1, SOX9 solos o en combinación. Mientras estudios previos han analizado los efectos de estos factores en la condrogénesis utilizando CMMs derivadas de MO [104] o en reparación de cartílago utilizando condrocitos [105, 106], no ha habido estudios evaluando la combinación de todos estos factores de transcripción y de crecimiento en la condrogénesis utilizando CMMs derivadas de TA.

Se han realizado estudios previos en CMM derivadas de MO, las cuales fueron transducidas con vectores denovirales codificantes para IGF-1, TGF-B1 y BMP-2 en donde a la vez que se evaluaba

la capacidad de estos factores solos y en combinación para inducir la diferenciación condrogénica también se evaluaron las dosis de transducción, observándose que a dosis bajas se incrementa la supervivencia de las células y presentan mayor producción de MEC [93, 94], en este trabajo se utilizaron dosis únicas de 100MOIs para la transducción, siendo interesante evaluar la combinación de IGF-1 y FGF-2 a dosis más bajas.

Los efectos de la co-expresión de factores de crecimiento en la condrogénesis de agregados de CMMs *in vitro* indicaron, a través de examinación histológica, que los agregados que recibieron Ad.FGF-2 junto con Ad. IGF-1 tuvieron una mayor producción de matriz que los otros grupos y que el control. La co-entrega de estos factores de crecimiento permitió un mayor tamaño de los agregados, mayor celularidad, y mayor depósito de PGCs. A pesar de que la producción de COL II fue prominente en los agregados, COL X también fue observada, indicando condrocitos hipertróficos hacia el término de su diferenciación.

Los resultados obtenidos también muestran un efecto potenciador de Ad.TGF- $\beta$ 1 en los agregados que lo recibieron, ellos muestran una prominente inmunotinción para COL II primariamente pericelular, y una baja inmunotinción para COL I; desafortunadamente también muestra una prominente inmunotinción para COL X. Estos hallazgos son consistentes con estudios previos relacionados con los efectos de factores de crecimiento en la condrogénesis de CMMs, en donde se observó que TGF- $\beta$ 1 controla la producción de matriz extracelular mediante la estimulación de la expresión de AGC y de la síntesis de COL II y X, los cuales fueron secretados más fuertemente por las CMMs derivadas de MO que por las obtenidas de TA [107, 108], teniendo esto un efecto positivo en la diferenciación a cartílago y su reparación. A pesar de que los efectos condrogénicos de TGF- $\beta$ 1 están bien caracterizados, los efectos de FGF-2 e IGF-1 están menos establecidos. IGF-1 modula la condrogénesis de CMMs derivadas de MO mediante estimulación e incremento de la proliferación celular, regulando la apoptosis celular, induciendo la expresión de marcadores condrogénicos y la síntesis de PGC y COL II *in vitro* [109, 110], habiéndose demostrado que la condrogénesis mejora incrementando la expresión de COL II y AGC cuando se da la combinación con TGF- $\beta$ 1, BMP-6, TGF- $\beta$ 3 [93, 94, 111-113]. Mientras tanto, se ha descrito que FGF-2 incrementa la proliferación celular, potencia el potencial condrogénico de CMMs derivadas de MO, estabiliza la expresión fenotípica e inhibe la diferenciación condrocítica terminal, en estudios en monocapa [114], y además, propiedades mitogénicas también han sido adscritas a FGF-2 *in vitro* para condrocitos articulares. El potenciamiento en la reparación del cartílago ha sido observado siguiendo la aplicación de la proteína recombinante FGF-2 [115], condrocitos transfectados [116] o

transferencia génica directa utilizando vectores virales adeno-asociados en defectos de CA in vivo [117]. Un estudio reciente [118] ha demostrado que la sobre-expresión de IGF-1 y FGF-2 en defectos de cartílago vía células NIH 3T3 embebidas en alginato, potencia la reparación de espesor total en defectos de cartílago osteocondral mayor que con IGF-1 solo. Ellos concluyen que estos dos factores se complementan a sí mismos, debido a que el FGF-2 potencia la condrogénesis temprana, mientras que IGF-1 ejerce su efecto en la proliferación condrocítica y la síntesis de la matriz a tiempos tardíos. No obstante a este y a otros estudios similares [119], los mecanismos exactos que controlan la condrogénesis mediante la sobre-expresión combinada de IGF-1 y FGF-2, aun no han sido establecidas.

En éste estudio, los análisis de expresión mostraron que los cultivos en agregados con IGF-1 mantuvieron una alta expresión para AGC, BGC, CM, PGC y COL II, pero así mismo, mantuvieron una alta expresión significativa para COL I y X. Los cultivos en agregados con FGF-2 incrementaron la expresión para BGC, CM, PGC y COL II, pero decrecieron para COL I y X a través del tiempo. Los agregados que recibieron la combinación de FGF-2 e IGF-1 presentaron una expresión temprana significativa para AGC, BGC, CM, PGC y COL II con respecto al control positivo, y éstos se mantuvieron con alta expresión significativa en todos los puntos a través del tiempo, siendo el más notable al día 28, en comparación con los otros grupos evaluados. Aunque los agregados transducidos con FGF-2/IGF-1 fueron también significativamente expresados para COL I al día 3, este fue rápidamente en decremento y fue el más bajamente expresado al día 28, en comparación con los otros grupos. En este grupo (Ad.IGF-1/Ad.FGF-2) el comportamiento del mRNA de COL X fue muy similar al del control positivo; con únicamente mayor expresión al día 14 de cultivo, evidenciando con ello la presencia de condrocitos hipertróficos. Los resultados de los estudios inmunohistológicos y de western blot para el mismo grupo de tratamiento experimental asemejan el comportamiento de expresión del mRNA y confirman que hay una producción óptima de COL II al día 28 de cultivo en agregados, mientras que la presencia de COL X y I es escasa e indetectable, respectivamente. Estos resultados sugieren que la co-expresión de IGF-1/FGF-2 acelera y potencia el proceso de condrogénesis pero no retrasa la diferenciación hipertrófica; sin embargo, esto último se tiene que considerar con precaución, ya que un estudio [120] reportó algunas limitaciones utilizando este tipo de marcadores condrogénicos en la diferenciación de CMMs. Usualmente COL X es utilizado como un marcador de etapas tardías indicando la presencia de condrocitos hipertróficos (asociado con osificación endocondral), pero en dicho estudio encontraron que COL X esta expresado como un evento temprano, siendo que en algunos casos, este se expreso antes que COL II. Este hallazgo fue sorprendente porque se entiende que las CMMs

tienen que diferenciarse a condrocitos antes de que ellas sean hipertróficas. Por lo que en nuestro estudio la expresión de COL X pudiera no indicar condrocitos hipertróficos durante la diferenciación temprana de las CMMs. En conclusión, en este estudio se demostró que la combinación de IGF-1 y FGF-2 incrementa la proliferación celular, el depósito de GAGs y colágenas, haciendo que los resultados sean aceptables para crear un implante pre-diferenciado de CMMs modificadas genéticamente, adecuado para estudios pre-clínicos en un modelo ovino.

Por último, una vez que se hubo determinado la mejor combinación de CMMs y factores de transcripción y crecimiento en la diferenciación a condrocitos, también se evaluó la utilidad de un soporte de alginato como andamio para la generación de un implante. El alginato es una alternativa propuesta para la elaboración de soportes macroporosos [121]. Se utiliza tanto en forma de soporte como en forma de gel en el tratamiento de las lesiones cartilaginosas u osteocartilaginosas. En esta última presentación, ha demostrado ser un buen transportador en el trasplante de condrocitos. Los resultados que se obtuvieron con este soporte fueron un alto índice de proliferación celular, una excelente distribución celular a lo largo del soporte, y su capacidad de mantenimiento del fenotipo celular. Sin embargo, tenía el inconveniente de que por su consistencia gelatinosa no se fijaba bien a los portaobjetos, despegándose fácilmente e impidiendo una evaluación objetiva del mismo a través de tinciones histológicas e inmunohistoquímicas, por lo que se deben buscar diferentes herramientas de análisis para evaluar la efectividad de este tipo de soporte.

Las limitaciones de este estudio incluyen la falta de la determinación de proteína para cada factor solo y en combinación, a lo largo de las mediciones. La falta de evaluaciones de combinaciones adicionales de los factores de transcripción y crecimiento seleccionados para definir las mejores condiciones de transducción en la diferenciación de las CMMs a condrocitos, aunque la combinación de IGF-1 y FGF-2 mostró ser adecuada para iniciar los estudios pre-clínicos en un modelo animal. Estos hallazgos soportan el concepto de implementar estas estrategias de transferencia génica para futuras investigaciones en la reparación del CA.

## **8. Conclusiones**

Este estudio reporta la potenciación de la diferenciación condrogénica de CMMs como resultado del efecto sinérgico de la sobre-expresión combinada de IGF-1/FGF-2 en las CMMs mediante la transferencia génica adenoviral, demostrado mediante análisis de expresión génica, histológica y bioquímica en comparación con la transducción de otros factores condrogénicos de crecimiento y de transcripción conocidos. También se reporta, que esta combinación promueve significativamente la producción de COL II mientras que limita la expresión de COL I y X, resultando en la generación de un implante in vitro con posible utilidad en ensayos de reparación de cartílago en modelos animales grandes y preclínicos.

## **9. Perspectivas**

1. Evaluar los niveles de los factores de crecimiento a nivel de traducción, durante el proceso de diferenciación de las CMMs a condrocitos.
2. Evaluar otras posibles combinaciones que podrían dar resultados interesantes como lo es la combinación de los factores IGF-1/TGF- $\beta$ 1/FGF-2.
3. Evaluar el soporte de alginato con otras técnicas histológicas y moleculares, diferentes a las ya probadas, para evaluarlo de manera adecuada por su naturaleza gelatinosa.
3. Evaluar la mejor combinación que nos resulto en este trabajo en otras matrices diferentes.
4. Realizar los ensayos in vivo en un modelo de O. aries, con la mejor combinación resultante para tratamiento de las lesiones de cartílago.



## 10. Referencias

1. Pavía-Mota. ED, González. ML, Briceño-Cortés. G: **Manejo de la Osteoartrosis en Medicina Familiar y Ortopedia**. *Archivos en Medicina Familiar* 2005, **7**:6.
2. Ayala. AHP, Fernández-López. JC: **Prevalencia y factores de riesgo de la osteoartritis**. *Reumatol Clin* 2007, **3**:6.
3. Chen FH, Rousche KT, Tuan RS: **Technology Insight: adult stem cells in cartilage regeneration and tissue engineering**. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2006, **2**:373-382.
4. Bentley G, Minas T: **Treating joint damage in young people**. *BMJ* 2000, **320**:1585-1588.
5. Cole BJ, Lee SJ: **Complex knee reconstruction: articular cartilage treatment options**. *Arthroscopy* 2003, **19 Suppl 1**:1-10.
6. Pollok JM, Vacanti JP: **Tissue engineering**. *Semin Pediatr Surg* 1996, **5**:191-196.
7. Dhinsa BS, Adesida AB: **Current clinical therapies for cartilage repair, their limitation and the role of stem cells**. *Curr Stem Cell Res Ther* 2012, **7**:143-148.
8. Nooeaid P, Salih V, Beier JP, Boccaccini AR: **Osteochondral tissue engineering: scaffolds, stem cells and applications**. *J Cell Mol Med* 2012.
9. Herbage D, Chajra H, Galois L, Freyria AM, Mallein-Gerin F: **[Biomaterials and cell therapy in cartilage disorders]**. *Bull Acad Natl Med* 2006, **190**:1399-1408; discussion 1408-1399, 1475-1397.
10. Moore KL, Persaud TVN: **El sistema esquelético**. In *Embriología Clínica El desarrollo del ser humano*. 7 edition. Edited by Elsevier. Toronto, Canadá: Elsevier; 2004: 381 - 398
11. Johnson KE: **Cartilage and bone**. In *Histology and cell biology*. 2 edition. Baltimore, Maryland: Williams & Wilkins; 1991: 107 - 122
12. Meyer U, Wiesmann HP: **Cartilage structure and function**. In *Bone and cartilage engineering*. 1 edition. Germany: Springer; 2006: 25 - 29
13. Meyer U, Wiesmann HP: **Chondrocyte structure and function**. In *Bone and cartilage engineering*. 1 edition. Germany: Springer; 2006: 30 - 32
14. Buckwalter JA, Mankin HJ: **Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions**. *Instr Course Lect* 1998, **47**:477-486.
15. Hagiwara H, Schroter-Kermani C, Merker HJ: **Localization of collagen type VI in articular cartilage of young and adult mice**. *Cell Tissue Res* 1993, **272**:155-160.
16. Martel-Pelletier J: **Pathophysiology of osteoarthritis**. *Osteoarthritis Cartilage* 1998, **6**:374-376.
17. Zhu W, Iatridis JC, Hlibczuk V, Ratcliffe A, Mow VC: **Determination of collagen-proteoglycan interactions in vitro**. *J Biomech* 1996, **29**:773-783.
18. Buckwalter JA, Martin J: **Degenerative joint disease**. *Clin Symp* 1995, **47**:1-32.
19. Pfaffle M, Borchert M, Deutzmann R, von der Mark K, Fernandez MP, Selmin O, Yamada Y, Martin G, Ruggiero F, Garrone R: **Anchorin CII, a collagen-binding chondrocyte surface protein of the calpactin family**. *Prog Clin Biol Res* 1990, **349**:147-157.
20. Glant TT, Hadhazy C, Mikecz K, Sipos A: **Appearance and persistence of fibronectin in cartilage. Specific interaction of fibronectin with collagen type II**. *Histochemistry* 1985, **82**:149-158.
21. Bhosale AM, Richardson JB: **Articular cartilage: structure, injuries and review of management**. *Br Med Bull* 2008, **87**:77-95.
22. Buckwalter JA: **Evaluating methods of restoring cartilaginous articular surfaces**. *Clin Orthop Relat Res* 1999:S224-238.

23. Aydelotte MB, Raiss RX, Caterson B, Kuettner KE: **Influence of interleukin-1 on the morphology and proteoglycan metabolism of cultured bovine articular chondrocytes.** *Connect Tissue Res* 1992, **28**:143-159.
24. Buckwalter JA, Mower D, Schafer J, Ungar R, Ginsberg B, Moore K: **Growth-plate-chondrocyte profiles and their orientation.** *J Bone Joint Surg Am* 1985, **67**:942-955.
25. Mankin HJ, Mankin CJ, Akeson WH, Dick HM, Friedlaender GE, Radin EL, Simon MA: **A curriculum for the ideal orthopaedic residency.** *Academic Orthopaedic Society. Clin Orthop Relat Res* 1997:270-281.
26. Guilak F, Ratcliffe A, Lane N, Rosenwasser MP, Mow VC: **Mechanical and biochemical changes in the superficial zone of articular cartilage in canine experimental osteoarthritis.** *J Orthop Res* 1994, **12**:474-484.
27. Walker GD, Fischer M, Gannon J, Thompson RC, Jr., Oegema TR, Jr.: **Expression of type-X collagen in osteoarthritis.** *J Orthop Res* 1995, **13**:4-12.
28. Flik KR, Verma N, Cole BJ, Bach BR: **Articular Cartilage. Structure, Biology, and Function.** In *Cartilage repair strategies. Volume 1.* 1 edition. New Jersey: Humana Press; 2007: 1 - 12
29. van den Berg WB, Bresnihan B: **Pathogenesis of joint damage in rheumatoid arthritis: evidence of a dominant role for interleukin-I.** *Baillieres Best Pract Res Clin Rheumatol* 1999, **13**:577-597.
30. Eyre DR, Wu JJ: **Collagen structure and cartilage matrix integrity.** *J Rheumatol Suppl* 1995, **43**:82-85.
31. Gillingly SD, Voight M, Blackburn T: **Treatment of articular cartilage defects of the knee with autologous chondrocyte implantation.** *J Orthop Sports Phys Ther* 1998, **28**:241-251.
32. Hunter W: **Of the structure and disease of articulating cartilages. 1743.** *Clin Orthop Relat Res* 1995:3-6.
33. Shortkroff S, Barone L, Hsu HP, Wrenn C, Gagne T, Chi T, Breinan H, Minas T, Sledge CB, Tubo R, Spector M: **Healing of chondral and osteochondral defects in a canine model: the role of cultured chondrocytes in regeneration of articular cartilage.** *Biomaterials* 1996, **17**:147-154.
34. Moskowitz RW, Goldberg VM, Malesud CJ: **Metabolic responses of cartilage in experimentally induced osteoarthritis.** *Ann Rheum Dis* 1981, **40**:584-592.
35. Minas T, Nehrer S: **Current concepts in the treatment of articular cartilage defects.** *Orthopedics* 1997, **20**:525-538.
36. Delaunay C: **[Arthroscopic assessment and clinical correlation of femoro-patellar tracking. Apropos of 116 knees in 115 patients under 40].** *Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot* 2000, **86**:482-490.
37. Ficat P, Arlet J, Lartigue G, Pujol M, Tan MA: **[Post-injury reflex algo-dystrophies. Hemodynamic and anatomopathological study].** *Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot* 1973, **59**:401-414.
38. Ficat RP, Philippe J, Hungerford DS: **Chondromalacia patellae: a system of classification.** *Clin Orthop Relat Res* 1979:55-62.
39. Hossain M, Alexander P, Burls A, Jobanputra P: **Foot orthoses for patellofemoral pain in adults.** *Cochrane Database Syst Rev* 2011:CD008402.
40. Insall JN: **Total knee arthroplasty in rheumatoid arthritis.** *Ryumachi* 1993, **33**:472.
41. Linden B: **Osteochondritis dissecans of the femoral condyles: a long-term follow-up study.** *J Bone Joint Surg Am* 1977, **59**:769-776.
42. Widuchowski W, Widuchowski J, Trzaska T: **Articular cartilage defects: study of 25,124 knee arthroscopies.** *Knee* 2007, **14**:177-182.

43. Hunziker EB: **Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects.** *Osteoarthritis Cartilage* 2002, **10**:432-463.
44. Green WT, Jr.: **Articular cartilage repair. Behavior of rabbit chondrocytes during tissue culture and subsequent allografting.** *Clin Orthop Relat Res* 1977:237-250.
45. Wei Y, Sun X, Wang W, Hu Y: **Adipose-derived stem cells and chondrogenesis.** *Cytotherapy* 2007, **9**:712-716.
46. Jackson DW, Simon TM: **Tissue engineering principles in orthopaedic surgery.** *Clin Orthop Relat Res* 1999:S31-45.
47. Salgado AJ, Oliveira JT, Pedro AJ, Reis RL: **Adult stem cells in bone and cartilage tissue engineering.** *Curr Stem Cell Res Ther* 2006, **1**:345-364.
48. Grande DA, Breitbart AS, Mason J, Paulino C, Laser J, Schwartz RE: **Cartilage tissue engineering: current limitations and solutions.** *Clin Orthop Relat Res* 1999:S176-185.
49. Huckle J, Dootson G, Medcalf N, McTaggart S, Wright E, Carter A, Schreiber R, Kirby B, Dunkelman N, Stevenson S, et al: **Differentiated chondrocytes for cartilage tissue engineering.** *Novartis Found Symp* 2003, **249**:103-112; discussion 112-107, 170-104, 239-141.
50. Holtzer H, Abbott J, Lash J, Holtzer S: **The Loss of Phenotypic Traits by Differentiated Cells in Vitro, I. Dedifferentiation of Cartilage Cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1960, **46**:1533-1542.
51. Freed LE, Hollander AP, Martin I, Barry JR, Langer R, Vunjak-Novakovic G: **Chondrogenesis in a cell-polymer-bioreactor system.** *Exp Cell Res* 1998, **240**:58-65.
52. Nguyen LV, Vanner R, Dirks P, Eaves CJ: **Cancer stem cells: an evolving concept.** *Nat Rev Cancer* 2012, **12**:133-143.
53. Ge Z, Li C, Heng BC, Cao G, Yang Z: **Functional biomaterials for cartilage regeneration.** *J Biomed Mater Res A* 2012.
54. Peretti GM, Xu JW, Bonassar LJ, Kirchhoff CH, Yaremchuk MJ, Randolph MA: **Review of injectable cartilage engineering using fibrin gel in mice and swine models.** *Tissue Eng* 2006, **12**:1151-1168.
55. Rahfoth B, Weisser J, Sternkopf F, Aigner T, von der Mark K, Brauer R: **Transplantation of allograft chondrocytes embedded in agarose gel into cartilage defects of rabbits.** *Osteoarthritis Cartilage* 1998, **6**:50-65.
56. Toolan BC, Frenkel SR, Pachence JM, Yalowitz L, Alexander H: **Effects of growth-factor-enhanced culture on a chondrocyte-collagen implant for cartilage repair.** *J Biomed Mater Res* 1996, **31**:273-280.
57. Grigolo B, Roseti L, Fiorini M, Fini M, Giavaresi G, Aldini NN, Giardino R, Facchini A: **Transplantation of chondrocytes seeded on a hyaluronan derivative (hyaff-11) into cartilage defects in rabbits.** *Biomaterials* 2001, **22**:2417-2424.
58. Cruz DM, Ivirico JL, Gomes MM, Ribelles JL, Sanchez MS, Reis RL, Mano JF: **Chitosan microparticles as injectable scaffolds for tissue engineering.** *J Tissue Eng Regen Med* 2008, **2**:378-380.
59. Lohmann CH, Schwartz Z, Niederauer GG, Carnes DL, Jr., Dean DD, Boyan BD: **Pretreatment with platelet derived growth factor-BB modulates the ability of costochondral resting zone chondrocytes incorporated into PLA/PGA scaffolds to form new cartilage in vivo.** *Biomaterials* 2000, **21**:49-61.
60. Chiang H, Jiang CC: **Repair of articular cartilage defects: review and perspectives.** *J Formos Med Assoc* 2009, **108**:87-101.

61. Wendt D, Jakob M, Martin I: **Bioreactor-based engineering of osteochondral grafts: from model systems to tissue manufacturing.** *J Biosci Bioeng* 2005, **100**:489-494.
62. Kessler MW, Grande DA: **Tissue engineering and cartilage.** *Organogenesis* 2008, **4**:28-32.
63. Jakob M, Demarteau O, Suetterlin R, Heberer M, Martin I: **Chondrogenesis of expanded adult human articular chondrocytes is enhanced by specific prostaglandins.** *Rheumatology (Oxford)* 2004, **43**:852-857.
64. Kosher RA, Walker KH: **The effect of prostaglandins on in vitro limb cartilage differentiation.** *Exp Cell Res* 1983, **145**:145-153.
65. Barnard JC, Williams AJ, Rabier B, Chassande O, Samarut J, Cheng SY, Bassett JH, Williams GR: **Thyroid hormones regulate fibroblast growth factor receptor signaling during chondrogenesis.** *Endocrinology* 2005, **146**:5568-5580.
66. Tsonis PA: **1,25-Dihydroxyvitamin D3 stimulates chondrogenesis of the chick limb bud mesenchymal cells.** *Dev Biol* 1991, **143**:130-134.
67. Hall BK: **Modulation of chondrocyte activity in vitro in response to ascorbic acid.** *Acta Anat (Basel)* 1981, **109**:51-63.
68. Quarto R, Campanile G, Cancedda R, Dozin B: **Thyroid hormone, insulin, and glucocorticoids are sufficient to support chondrocyte differentiation to hypertrophy: a serum-free analysis.** *J Cell Biol* 1992, **119**:989-995.
69. Kulyk WM, Hoffman LM: **Ethanol exposure stimulates cartilage differentiation by embryonic limb mesenchyme cells.** *Exp Cell Res* 1996, **223**:290-300.
70. Kulyk WM, Reichert C: **Staurosporine, a protein kinase inhibitor, stimulates cartilage differentiation by embryonic facial mesenchyme.** *J Craniofac Genet Dev Biol* 1992, **12**:90-97.
71. Rodgers BJ, Kulyk WM, Kosher RA: **Stimulation of limb cartilage differentiation by cyclic AMP is dependent on cell density.** *Cell Differ Dev* 1989, **28**:179-187.
72. Wlodarski KH, Galus K: **Osteoblastic and chondroblastic response to a variety of locally administered immunomodulators in mice.** *Folia Biol (Praha)* 1992, **38**:284-292.
73. Kato Y, Iwamoto M, Koike T, Suzuki F: **Effect of vanadate on cartilage-matrix proteoglycan synthesis in rabbit costal chondrocyte cultures.** *J Cell Biol* 1987, **104**:311-319.
74. Evans CH, Robbins PD: **Possible orthopaedic applications of gene therapy.** *J Bone Joint Surg Am* 1995, **77**:1103-1114.
75. Martinek V, Uebliacker P, Imhoff AB: **Current concepts of gene therapy and cartilage repair.** *J Bone Joint Surg Br* 2003, **85**:782-788.
76. Trippel S, Cucchiaroni M, Madry H, Shi S, Wang C: **Gene therapy for articular cartilage repair.** *Proc Inst Mech Eng H* 2007, **221**:451-459.
77. Nixon AJ, Haupt JL, Frisbie DD, Morisset SS, McIlwraith CW, Robbins PD, Evans CH, Ghivizzani S: **Gene-mediated restoration of cartilage matrix by combination insulin-like growth factor-I/interleukin-1 receptor antagonist therapy.** *Gene Ther* 2005, **12**:177-186.
78. Roessler BJ, Allen ED, Wilson JM, Hartman JW, Davidson BL: **Adenoviral-mediated gene transfer to rabbit synovium in vivo.** *J Clin Invest* 1993, **92**:1085-1092.
79. Madry H, Zurakowski D, Trippel SB: **Overexpression of human insulin-like growth factor-I promotes new tissue formation in an ex vivo model of articular chondrocyte transplantation.** *Gene Ther* 2001, **8**:1443-1449.
80. Moller HD, Fu FH, Niyibizi C, Studer RK, Georgescu HJ, Robbins PD, Evans CH: **[TGF-beta-1 gene transfer in joint cartilage cells. Stimulating effect in extracellular matrix synthesis].** *Orthopade* 2000, **29**:75-79.

81. Tomita T, Hashimoto H, Tomita N, Morishita R, Lee SB, Hayashida K, Nakamura N, Yonenobu K, Kaneda Y, Ochi T: **In vivo direct gene transfer into articular cartilage by intraarticular injection mediated by HVJ (Sendai virus) and liposomes.** *Arthritis Rheum* 1997, **40**:901-906.
82. Mason JM, Breitbart AS, Barcia M, Porti D, Pergolizzi RG, Grande DA: **Cartilage and bone regeneration using gene-enhanced tissue engineering.** *Clin Orthop Relat Res* 2000:S171-178.
83. Crystal RG: **Transfer of genes to humans: early lessons and obstacles to success.** *Science* 1995, **270**:404-410.
84. Steinert AF, Noth U, Tuan RS: **Concepts in gene therapy for cartilage repair.** *Injury* 2008, **39 Suppl 1**:S97-113.
85. Xie WF, Kondo S, Sandell LJ: **Regulation of the mouse cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein gene by the transcription factor AP-2.** *J Biol Chem* 1998, **273**:5026-5032.
86. Lefebvre V, Zhou G, Mukhopadhyay K, Smith CN, Zhang Z, Eberspaecher H, Zhou X, Sinha S, Maity SN, de Crombrughe B: **An 18-base-pair sequence in the mouse proalpha1(II) collagen gene is sufficient for expression in cartilage and binds nuclear proteins that are selectively expressed in chondrocytes.** *Mol Cell Biol* 1996, **16**:4512-4523.
87. Valhmu WB, Stazzone EJ, Bachrach NM, Saed-Nejad F, Fischer SG, Mow VC, Ratcliffe A: **Load-controlled compression of articular cartilage induces a transient stimulation of aggrecan gene expression.** *Arch Biochem Biophys* 1998, **353**:29-36.
88. Steinert AF, Ghivizzani SC, Rethwilm A, Tuan RS, Evans CH, Noth U: **Major biological obstacles for persistent cell-based regeneration of articular cartilage.** *Arthritis Res Ther* 2007, **9**:213.
89. Prockop DJ, Phinney DG, Bunnell BA: *Mesenchymal Stem Cells. Methods and Protocols.* New Jersey, USA.: Humana Press; 2008.
90. Kuroda R, Ishida K, Matsumoto T, Akisue T, Fujioka H, Mizuno K, Ohgushi H, Wakitani S, Kurosaka M: **Treatment of a full-thickness articular cartilage defect in the femoral condyle of an athlete with autologous bone-marrow stromal cells.** *Osteoarthritis Cartilage* 2007, **15**:226-231.
91. Wakitani S, Nawata M, Tensho K, Okabe T, Machida H, Ohgushi H: **Repair of articular cartilage defects in the patello-femoral joint with autologous bone marrow mesenchymal cell transplantation: three case reports involving nine defects in five knees.** *J Tissue Eng Regen Med* 2007, **1**:74-79.
92. Tuli R, Li WJ, Tuan RS: **Current state of cartilage tissue engineering.** *Arthritis Res Ther* 2003, **5**:235-238.
93. Steinert AF, Palmer GD, Pilapil C, Noth U, Evans CH, Ghivizzani SC: **Enhanced in vitro chondrogenesis of primary mesenchymal stem cells by combined gene transfer.** *Tissue Eng Part A* 2009, **15**:1127-1139.
94. Palmer GD, Steinert A, Pascher A, Gouze E, Gouze JN, Betz O, Johnstone B, Evans CH, Ghivizzani SC: **Gene-induced chondrogenesis of primary mesenchymal stem cells in vitro.** *Mol Ther* 2005, **12**:219-228.
95. Luo J, Deng ZL, Luo X, Tang N, Song WX, Chen J, Sharff KA, Luu HH, Haydon RC, Kinzler KW, et al: **A protocol for rapid generation of recombinant adenoviruses using the AdEasy system.** *Nat Protoc* 2007, **2**:1236-1247.
96. Dubois SG, Floyd EZ, Zvonic S, Kilroy G, Wu X, Carling S, Halvorsen YD, Ravussin E, Gimble JM: **Isolation of human adipose-derived stem cells from biopsies and liposuction specimens.** *Methods Mol Biol* 2008, **449**:69-79.

97. Livak KJ, Schmittgen TD: **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.** *Methods* 2001, **25**:402-408.
98. Reger RL, Tucker AH, Wolfe MR: **Differentiation and characterization of human MSCs.** *Methods Mol Biol* 2008, **449**:93-107.
99. Lee RH, Kim B, Choi I, Kim H, Choi HS, Suh K, Bae YC, Jung JS: **Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue.** *Cell Physiol Biochem* 2004, **14**:311-324.
100. Pittenger MF: **Mesenchymal stem cells from adult bone marrow.** *Methods Mol Biol* 2008, **449**:27-44.
101. Hu G, Liu P, Feng J, Jin Y: **A novel population of mesenchymal progenitors with hematopoietic potential originated from CD14 peripheral blood mononuclear cells.** *Int J Med Sci* 2010, **8**:16-29.
102. Trippel SB, Ghivizzani SC, Nixon AJ: **Gene-based approaches for the repair of articular cartilage.** *Gene Ther* 2004, **11**:351-359.
103. Estes BT, Diekman BO, Gimple JM, Guilak F: **Isolation of adipose-derived stem cells and their induction to a chondrogenic phenotype.** *Nat Protoc* 2010, **5**:1294-1311.
104. Ronziere MC, Perrier E, Mallein-Gerin F, Freyria AM: **Chondrogenic potential of bone marrow- and adipose tissue-derived adult human mesenchymal stem cells.** *Biomed Mater Eng* 2010, **20**:145-158.
105. Munirah S, Samsudin OC, Aminuddin BS, Ruszymah BH: **Expansion of human articular chondrocytes and formation of tissue-engineered cartilage: a step towards exploring a potential use of matrix-induced cell therapy.** *Tissue Cell* 2010, **42**:282-292.
106. Yaeger PC, Masi TL, de Ortiz JL, Binette F, Tubo R, McPherson JM: **Synergistic action of transforming growth factor-beta and insulin-like growth factor-I induces expression of type II collagen and aggrecan genes in adult human articular chondrocytes.** *Exp Cell Res* 1997, **237**:318-325.
107. Mehlhorn AT, Niemeyer P, Kaiser S, Finkenzeller G, Stark GB, Sudkamp NP, Schmal H: **Differential expression pattern of extracellular matrix molecules during chondrogenesis of mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue.** *Tissue Eng* 2006, **12**:2853-2862.
108. Barry F, Boynton RE, Liu B, Murphy JM: **Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components.** *Exp Cell Res* 2001, **268**:189-200.
109. Martin JA, Scherb MB, Lembke LA, Buckwalter JA: **Damage control mechanisms in articular cartilage: the role of the insulin-like growth factor I axis.** *Iowa Orthop J* 2000, **20**:1-10.
110. Patil AS, Sable RB, Kothari RM: **An update on transforming growth factor-beta (TGF-beta): sources, types, functions and clinical applicability for cartilage/bone healing.** *J Cell Physiol* 2011, **226**:3094-3103.
111. Khan WS, Adesida AB, Tew SR, Lowe ET, Hardingham TE: **Bone marrow-derived mesenchymal stem cells express the pericyte marker 3G5 in culture and show enhanced chondrogenesis in hypoxic conditions.** *J Orthop Res* 2010, **28**:834-840.
112. Indrawattana N, Chen G, Tadokoro M, Shann LH, Ohgushi H, Tateishi T, Tanaka J, Bunyaratvej A: **Growth factor combination for chondrogenic induction from human mesenchymal stem cell.** *Biochem Biophys Res Commun* 2004, **320**:914-919.
113. Fukumoto T, Sperling JW, Sanyal A, Fitzsimmons JS, Reinholz GG, Conover CA, O'Driscoll SW: **Combined effects of insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-**

- beta1 on periosteal mesenchymal cells during chondrogenesis in vitro.** *Osteoarthritis Cartilage* 2003, **11**:55-64.
114. Handorf AM, Li WJ: **Fibroblast growth factor-2 primes human mesenchymal stem cells for enhanced chondrogenesis.** *PLoS One* 2011, **6**:e22887.
  115. Maehara H, Sotome S, Yoshii T, Torigoe I, Kawasaki Y, Sugata Y, Yuasa M, Hirano M, Mochizuki N, Kikuchi M, et al: **Repair of large osteochondral defects in rabbits using porous hydroxyapatite/collagen (HAp/Col) and fibroblast growth factor-2 (FGF-2).** *J Orthop Res* 2010, **28**:677-686.
  116. Kaul G, Cucchiariini M, Arntzen D, Zurakowski D, Menger MD, Kohn D, Trippel SB, Madry H: **Local stimulation of articular cartilage repair by transplantation of encapsulated chondrocytes overexpressing human fibroblast growth factor 2 (FGF-2) in vivo.** *J Gene Med* 2006, **8**:100-111.
  117. Cucchiariini M, Madry H, Ma C, Thurn T, Zurakowski D, Menger MD, Kohn D, Trippel SB, Terwilliger EF: **Improved tissue repair in articular cartilage defects in vivo by rAAV-mediated overexpression of human fibroblast growth factor 2.** *Mol Ther* 2005, **12**:229-238.
  118. Madry H, Orth P, Kaul G, Zurakowski D, Menger MD, Kohn D, Cucchiariini M: **Acceleration of articular cartilage repair by combined gene transfer of human insulin-like growth factor I and fibroblast growth factor-2 in vivo.** *Arch Orthop Trauma Surg* 2010, **130**:1311-1322.
  119. Loeser RF, Chubinskaya S, Pacione C, Im HJ: **Basic fibroblast growth factor inhibits the anabolic activity of insulin-like growth factor 1 and osteogenic protein 1 in adult human articular chondrocytes.** *Arthritis Rheum* 2005, **52**:3910-3917.
  120. Mwale F, Stachura D, Roughley P, Antoniou J: **Limitations of using aggrecan and type X collagen as markers of chondrogenesis in mesenchymal stem cell differentiation.** *J Orthop Res* 2006, **24**:1791-1798.
  121. Guo JF, Jourdian GW, MacCallum DK: **Culture and growth characteristics of chondrocytes encapsulated in alginate beads.** *Connect Tissue Res* 1989, **19**:277-297.